

**Untersuchungen
zu Pathogenität, Hitzeresistenz
und Acriflavinempfindlichkeit
von Listerienstämmen**

Sabine Steinmeyer

Disbui. München

1989



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554827_0060

Aus dem Institut für Hygiene und Technologie
der Lebensmittel tierischen Ursprungs
(Lehrstuhl: Prof. Dr. G. Terplan)
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

Untersuchungen zu Pathogenität, Hitzeresistenz
und Acriflavinempfindlichkeit von Listerienstämmen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Sabine Steinmeyer
aus
Nördlingen

München 1988

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. M. Rüsse

Referent: Univ.-Prof. Dr. Dr.h.c. G. Terplan

Korreferent: Priv.Do. Dr. Dr.habil. W. Rambeck

Tag der Promotion: 24. Februar 1989

DISSERTATIONS- UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstr. 15, Tel. 288663

Meinen Eltern
in Dankbarkeit

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1.	EINLEITUNG	1
2.	SCHRIFTTUM	3
2.1.	Allgemeines zur Gattung Listeria	3
2.1.1.	Kurzbeschreibung	3
2.1.2.	Humanmedizinische Bedeutung	5
2.1.3.	Taxonomie	6
2.2.	Über die Pathogenität von Listerien	10
2.2.1.	Tierversuche zum Nachweis der Pathogenität von Listerienstämmen	10
2.2.1.1.	Antonscher Augenversuch	10
2.2.1.2.	Mäusepathogenitätstest	11
2.2.1.3.	Nachweis der Pathogenität am bebrüteten Hühnerei	13
2.2.2.	Nachweis der Pathogenität anhand von Zellkulturen	15
2.2.3.	Hämolyseverhalten und Pathogenität der einzelnen Listerienspezies	16
2.2.4.	Hämolysin als Virulenzfaktor	20
2.3.	Hitzeresistenzverhalten von Listerien mit besonderer Berücksichtigung der Milchpasteurisierung	23
2.4.	Acriflavin - eine Selektivsubstanz in der Listeriendiagnostik	35
3.	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	37
3.1.	Pathogenitätstest am bebrüteten Hühnerei	37
3.1.1.	Medien und Reagenzien	37
3.1.2.	Material	37
3.1.3.	Methodik	40
3.1.4.	Ergebnisse	43

3.2.	Untersuchungen zur Hitzeresistenz von Listerien	49
3.2.1.	Modellversuch einer Milchpasteurisierung mit in vitro phagozytierten Listerien	49
3.2.1.1.	Medien und Reagenzien	49
3.2.1.2.	Material	50
3.2.1.3.	Methodik	51
3.2.1.4.	Ergebnisse	57
3.2.2.	D-Wert-Bestimmungen in Glasröhrchen	60
3.2.2.1.	Medien und Reagenzien	60
3.2.2.2.	Material	60
3.2.2.3.	Methodik	61
3.2.2.4.	Ergebnisse	62
3.3.	Empfindlichkeit verschiedener Listerienstämme gegen unterschiedliche Acriflavinkonzentrationen	76
3.3.1.	Medien und Reagenzien	76
3.3.2.	Material	76
3.3.3.	Methodik	77
3.3.4.	Ergebnisse	77
4.	BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE UND DISKUSSION	85
5.	ZUSAMMENFASSUNG	98
	SUMMARY	99
6.	LITERATURVERZEICHNIS	100

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ATCC: American Type Culture Collection (Rockville, USA)

CFU: Kolonie bildende Einheit (Colony Forming Unit)

FDA: Food and Drug Administration

L.: Listeria

NCTC: National Collection of Type Cultures (London, UK)

rpm: Umdrehungen pro minute (rotations per minute)

SLCC: Special Listeria Culture Collection (Würzburg)

Sv: Serovar

USDA: United State Department of Agriculture

1. EINLEITUNG

Drei in Nordamerika durch *Listeria monocytogenes* in Lebensmitteln bedingte Listerioseausbrüche der letzten Jahre, verursacht durch Krautsalat (SCHLECH et al., 1983) und "Mexican-style cheese", eine Art Labkäse (JAMES et al., 1985) bzw. aufgrund epidemiologischer Überlegungen pasteurisierter Milch zugeschrieben (FLEMING et al., 1985) und nicht zuletzt die Erkrankung von 122 Personen im Kanton Waadt in der Schweiz an Listeriose nach Genuß einer Rotschmierekäsesorte (BILLE, 1988), gaben Anlaß zu ausgedehnten Untersuchungen, insbesondere an Käse, aber auch an anderen Lebensmitteln.

Zwar wurde auch früher schon ein Zusammenhang zwischen dem Verzehr kontaminierter Lebensmittel und menschlicher Listeriose vermutet, ohne daß jedoch für den Verbraucherschutz besondere Maßnahmen erwogen wurden. Durch die oben genannten Ausbrüche wurden nun einige Lebensmittel als tatsächliche Verursacher erkannt, woraus sich z. T. sehr drastische - vielfach auch nicht mehr verhältnismäßige - Interventionen der Gesundheitsbehörden ergaben. Im Zusammenhang mit den weltweit fast spontan induzierten Untersuchungen, deren Bewertung und der Suche nach Abwehrmaßnahmen ergaben sich eine Reihe von Fragen, die eine dringende Bearbeitung erforderten. So sollten im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen folgende Teilprobleme berücksichtigt werden: Pathogenitätskriterien von Listerien, Hitzeresistenz bei der Milchpasteurisierung und Verbesserung der kulturellen Isolierung.

Für in die USA importierte Lebensmittel mußten auf den Untersuchungsmethoden der Food and Drug Administration (FDA) beruhende Zertifikate vorgelegt werden. Die FDA (LOVETT et al., 1987) forderte in ihrer Nachweismethode für Listerien u. a. den Mäuse-test zum Nachweis der Pathogenität isolierter Listerienstämme. Angesichts der zahlreichen aus Lebensmitteln isolierten Listerienstämme erhob sich die Frage, ob dieser mit erheblichem Versuchstier-, Zeit- und Kostenaufwand verbundene Test - auch im Hinblick auf den Tierschutz - nicht durch einen anderen ersetzt

werden kann. Als Alternative bot sich die früher beschriebene, dann jedoch nicht weiter verfolgte Infektion des bebrüteten Hühnereies an, die an Listerienreferenzstämmen und mit aus Lebensmitteln isolierten Stämmen in der vorliegenden Arbeit erprobt werden sollte.

Zwei der oben angeführten Listerioseausbrüche in den USA gaben Anlaß zu der Vermutung, daß Listerien, eventuell geschützt als phagozytierte Keime (FLEMING et al., 1985), die Pasteurisierung der Milch überleben könnten. Diese Hypothese und die widersprüchlichen Angaben in der Literatur zur Hitzeresistenz der Listerien gaben Anlaß zu Pasteurisierungsversuchen mit phagozytierten Listerien in Rohmilch und zu Hitzeresistenzprüfungen an verschiedenen Listerienstämmen.

Die Beobachtung, daß einerseits aus Käse an unserem Institut überwiegend Stämme der Serovar 1/2 a isoliert wurden, andererseits sämtliche epidemiologischen Ausbrüche durch die Serovar 4 b verursacht worden waren, ließ die Vermutung aufkommen, daß diese Serovar gegen das in den meisten Anreicherungsmedien verwendete, selektiv wirkende Acriflavin eine vielleicht höhere Empfindlichkeit besitzt und deswegen seltener nachgewiesen wird. In den vorliegenden Untersuchungen sollte daher auch die Stichhaltigkeit dieser Vermutungen geprüft werden.

2. SCHRIFTTUM

2.1. Allgemeines zur Gattung *Listeria*

2.1.1. Kurzbeschreibung (in Anlehnung an AMTSBERG, 1980)

Erstbeschreibung: 1926 durch MURRAY, WEBB und SWANN:
"Bacterium monocytogenes"

Taxonomie: wird in der 1. Auflage des *BERGEY'S MANUAL of Systematic Bacteriology*, Vol. 2 (SEELIGER und JONES, 1986) zu den regulären, nicht-sporenbildenden, grampositiven Bakterien gerechnet

Morphologie: kokkoides, an den Enden abgerundetes Stäbchen mit einer Länge von 0.5-2 μm , das weder Sporen noch Kapseln bildet. Auftreten in Glatt (S)-formen und Rauh (R)-formen; bei letzterer kann Fadenbildung auftreten

Beweglichkeit: wesentliches differentialdiagnostisches Merkmal (rotierende Bewegungen, aber auch Schwing- und Taumelbewegungen); am ausgeprägtesten bei Züchtungstemperaturen von 20-25 °C (4 peritrich angeordnete Geißeln)

Kulturelle Eigenschaften: relativ anspruchslos; wächst auf allen gebräuchlichen Nährböden; wächst im Temperaturbereich von 3-45 °C, Wachstumsoptimum zwischen 30 und 35 °C. Wachstum im pH-Bereich 5.6-9.6, erst ab pH 4.8 ist keine Keimzunahme mehr zu verzeichnen; aerob-mikroaerophil

Biochemische Eigenschaften:	die verschiedenen Arten der Gattung <i>Listeria</i> können durch ihr unterschiedliches Verhalten hinsichtlich Kohlenhydratspaltung und Hämolysebildung differenziert werden
Tenazität:	Überleben in Bouillonkulturen mit NaCl-Konzentrationen von 6-24 % für mehrere Wochen. In der Außenwelt sehr resistent (z.B. 130 Tage Überlebenszeit im Winter an einer verschmutzten Stalltür)
Vorkommen:	Das Wirtsspektrum umfaßt sowohl den Menschen und die Haustiere, als auch Wild- und Zootiere, Laboratoriumstiere, wildlebende Nagetiere, Vögel, Kaltblüter und Insekten. <i>Listerien</i> werden aber auch im Erdboden, auf Pflanzen und im Wasser gefunden und können somit als ubiquitär bezeichnet werden
Infektionsroute:	i.d.R. oral, bei der zerebralen Verlaufsform ist auch eine neurogen aszendierende Infektion des Gehirns von kleinen Verletzungen der Mund- und Nasenschleimhaut möglich (ASAHI et al., 1957)
Krankheitsformen:	werden bei Mensch und Tier nur durch die Spezies <i>L. monocytogenes</i> und <i>L. ivanovii</i> hervorgerufen
beim Tier:	1) zerebrale Form: Gehirnlisteriose, Encephalitis, Meningoencephalitis 2) metrogene Form: <i>Listerien</i>-Abort, septische Metritis 3) septikämische Form: <i>Listerien</i>-Septikämie daneben noch 4) Keratokonjunktivitis 5) Mastitis

- beim Menschen:
- 1) akute septische Form:
Neugeborenen-Listeriose, Granulomatosis
infantisepctica
 - 2) Listeriose des ZNS: Meningitis,
Encephalitis, Meningoencephalitis
 - 3) glanduläre Form: Lymphadenitis,
Monocytenangina
 - 4) lokale Form: Hautlisteriose,
Konjunktivitis
 - 5) chronisch-septische Form mit isoliertem
Organbefall: Endokarditis, Abszeß usw.

2.1.2. Humanmedizinische Bedeutung

Die Listeriose stellt eine seltene Infektionskrankheit dar, die in der Regel sporadisch auftritt. Die klinische Manifestation wird begünstigt durch dispositionelle und konstitutionelle Faktoren wie Schwangerschaft (Affinität des Erregers zum graviden Uterus), Säuglings- und höheres Lebensalter, subakute und schwere chronische Erkrankungen, aber auch durch häufige Applikation von Kortikosteroiden und Immunsuppressiva. SEELIGER (1988) stellte die Frage auf, warum *L. monocytogenes* zwar sehr häufig in Lebensmitteln gefunden wird, die Zahl der tatsächlichen Erkrankungen aber im Verhältnis dazu sehr gering ist; eine mögliche Begründung wären seiner Ansicht nach subklinische Infektionen, die zu einer Immunität führen.

Außer von der Empfänglichkeit des Individuums hängt das Manifestwerden der Erkrankung auch sehr von der Virulenz der einzelnen Listerienstämme ab. So wiesen KAMPELMACHER et al. (1972), ORTEL (1975) und KAMPELMACHER et al. (1976) im Darm von Schwangeren, die bezüglich Listeriose zu einer Risikogruppe gehören, bei 24-44 % der Frauen während der Schwangerschaft und im Puerperium Listerien nach, darunter auch *Listeria monocytogenes*, ohne daß die Neugeborenen an einer auf Listerien zurückzuführenden Erkrankung gelitten hätten.

2.1.3. Taxonomie

Nachdem MURRAY et al. (1926) den Erreger einer in einem Versuchstierkaninchenbestand ausgebrochenen Seuche unter dem Namen "Bacterium monocytogenes" (da dieser in infizierten Tieren eine Monocytose auslöste) beschrieben hatten, fand PIRIE (1927) unabhängig davon in Südafrika bei Wüstenspringmäusen die gleiche Keimart und nannte sie in Verehrung von Lord Lister "Listerella hepatolytica" (aufgrund der durch sie hervorgerufenen Lebernekrosen). Nach der Erkenntnis, daß die beiden Keime identisch waren, wurden sie als "Listerella monocytogenes" bezeichnet. 1940 erfolgte auf Vorschlag PIRIE'S die Umbenennung in *Listeria monocytogenes*, da der Gattungsname *Listerella* bereits für eine Pilzart vergeben war.

Die Isolierung von *Listerien*stämmen nahm im Laufe der Zeit stark zu und alsbald wurde mit serologischen Untersuchungen über die Antigenzusammensetzungen begonnen.

JULIANELLE und PONS (1939) sprachen noch von zwei serologischen Gruppen, PATERSON (1940a) teilte die verschiedenen *Listerien*stämmen anhand ihrer somatischen (O) Antigene und der Geißel (H)-antigene bereits in vier Agglutinationsgruppen ein.

DONKER-VOET (1958, 1959, 1966 und 1972) wie auch SEELIGER und HÖHNE (1979) trugen zur Erweiterung des PATERSONschen Schemas bei, so daß die Spezies *Listeria monocytogenes* (sensu lato) gegenwärtig in 7 Serovaren (und Subserovaren) eingeteilt wird. Die Spezies *L. denitrificans* (PREVOT, 1961), *L. grayi* (LARSEN und SEELIGER, 1966) und *L. murrayi* (WELSHIMER und MEREDITH, 1971) wurden ebenfalls der Gattung *Listeria* angegliedert.

ROCOURT et al. (1982, 1983) nahmen anhand von DNA-Verwandtschaften und biochemischer Merkmale eine weitere Einteilung der Spezies *L. monocytogenes* in fünf "genomic groups" vor. *L. monocytogenes* (sensu lato) wird dadurch aufgegliedert in:

- L. monocytogenes* (sensu stricto) (ROCOURT et al., 1982),
- L. innocua* (SEELIGER, 1981),
- L. seeligeri* (ROCOURT und GRIMONT, 1983),
- L. welshimeri* (ROCOURT und GRIMONT, 1983) sowie
- L. ivanovii* (SEELIGER et al., 1984).

Die Einordnung von *L. grayi*, *L. murrayi* und *L. denitrificans* ist bis heute noch nicht ganz geklärt. FIEDLER und SEGER (1983) wiesen nach, daß der Mureintyp der Zellwand von *L. denitrificans* sich stark von *L. monocytogenes* unterscheidet. Dies führten SEELIGER und JONES (1986) zur Begründung ihrer Ansicht, daß nämlich *L. denitrificans* nicht zur Gattung *Listeria* gehöre, an.

ROCOURT et al. (1987a) verglichen die 16S rRNA von *L. denitrificans* mit der von *L. monocytogenes* und benachbarten Genera: die geringen Gemeinsamkeiten veranlaßten die Autoren vorzuschlagen, diese Spezies als *Jonesia denitrificans* comb. nov. einer neuen Gattung *Jonesia* gen. nov. zuzuordnen. JONES (1988) und ROCOURT (1988) bekräftigten endgültig die Anschauung, diese Spezies als separates Genus zu betrachten. STUART und WELSHIMER (1974) schlugen, da sie zwischen *L. monocytogenes* sensu lato einerseits und *L. grayi* und *L. murrayi* andererseits nur eine geringe DNA-Verwandtschaft entdeckt hatten (STUART und WELSHIMER, 1973), vor, für diese beiden Spezies eine neue Gattung "Murraya" zu schaffen. Demgegenüber verteidigten FIEDLER und SEGER (1983) die Stellung von *L. grayi* und *L. murrayi* in der Gattung *Listeria*, da deren Mureintypen dem von *L. monocytogenes* entsprechen. Derselben Ansicht sind auch ROCOURT et al. (1987b), die eine enge Verwandtschaft in der 16S rRNA von *L. monocytogenes*, *L. grayi* und *L. murrayi* nachwiesen.

Mit SEELIGER und JONES (1986) wird gegenwärtig die taxonomische Einteilung der Gattung *Listeria* so vorgenommen:

Spezies:	* <i>Listeria monocytogenes</i>
	* <i>Listeria innocua</i>
	* <i>Listeria ivanovii</i>
	* <i>Listeria seeligeri</i>
	* <i>Listeria welshimeri</i>

Spezies	* <i>Listeria grayi</i> ^{a)}
incertae sedis:	* <i>Listeria murrayi</i> ^{a)}
	* <i>Listeria denitrificans</i> ^{b)}

a) Zuordnung zur Gattung *Listeria* noch nicht endgültig

b) wird nicht mehr der Gattung *Listeria* zugerechnet, sondern einer neuen Gattung *Jonesia* (JONES, 1988; ROCOURT, 1988)

Über Pathogenität und Hämolyseverhalten wird im nächsten Kapitel gesprochen. Es sei hier nur vorweggenommen, daß *L. monocytogenes* und in beschränktem Maße auch *L. ivanovii* als pathogen gelten und β -hämolytisch sind. Die Spezies *L. seeligeri* zeigt zwar β -Hämolyse, wenn auch schwach, gilt aber als apathogen. An dieser Stelle noch einiges zur biochemischen Differenzierung der einzelnen Spezies (nach SEELIGER und JONES, 1986) (Tab. 1):

- Nitrat: wird nur von *L. denitrificans* und *L. murrayi* in Nitrit umgewandelt
- Mannit: wird nur von *L. grayi* und *L. murrayi* vergoren
- Rhamnose: wird von *L. monocytogenes* vergoren, nicht hingegen von *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. grayi* und *L. denitrificans*; das Verhalten von *L. innocua*, *L. welshimeri* und *L. murrayi* wechselt
- Xylose: wird von *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. ivanovii* und *L. denitrificans* abgebaut, von den anderen Spezies nicht

Tabelle 1: Biochemische Differenzierung der "genomic groups" von *Listeria monocytogenes* sensu lato (in Anlehnung an SEELIGER, 1984) sowie von *L. grayi*, *L. murrayi* und *L. denitrificans* (nach SEELIGER und JONES, 1986)

"genomic group"	Name	Sero- vare	Spaltung von			Nitrat- reduktion
			Mannit	Rhamnose	Xylose	
1	<i>L. mono- cytogenes</i>	1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a,3b,3c, 4a,4ab,4b, 4c,4d,4e, "7"	-	+	-	-
2	<i>L. iva- novii</i>	5	-	-	+	-
3	<i>L. in- nocua</i>	6a,6b, 4ab u.s. 3*	-	+/-	-	-
4	<i>L. wel- shimeri</i>	6a,6b	-	+/-	+	-
5	<i>L. see- ligeri</i>	1/2b, 4c,4d, 6b** u.s.	-	-	+	-
	<i>L. grayi</i>		+	-	-	-
	<i>L. murrayi</i>		+	+/-	-	+
	<i>L. denitri- ficans</i>		-	-	+	+

*) KNORZ und HOF (1986) zählen auch einige Stämme (ohne Hämolysebildung) der Serovar 3 zu *L. innocua*

**) Einordnung dieses Stammes noch ungeklärt

u.s. undesigned serovar

2.2. Über die Pathogenität von Listerien

2.2.1. Tierversuche zum Nachweis der Pathogenität von Listerienstämmen

Tierversuche wurden anfänglich noch zu diagnostischen Zwecken eingesetzt, d. h. um zu klären, ob es sich bei dem aus infektiösem Material isolierten Keim um eine Listerie handelt. Mit der Verbesserung der Nachweismethoden durch feste und flüssige Nährböden werden Tierversuche heute vor allem zur Unterscheidung zwischen pathogenen bzw. apathogenen Stämmen eingesetzt, bei unklarem biochemischen oder Hämolyseverhalten, aber auch um Virulenzunterschiede einzelner Stämme zu erfassen.

Nach SEELIGER (1961) läßt sich die experimentelle Pathogenität von Listerienstämmen an allen Labortieren nachweisen, aber Hamster (KAUTTER et al., 1963) und erwachsene Ratte (KEMENES, 1972) haben sich als resistent erwiesen.

Nachfolgend ein Literaturüberblick über die drei am häufigsten angewandten Tierversuche.

2.2.1.1. Antonscher Augenversuch

Auf der Suche nach einem Tierversuch, der mehr als die bisher ausgeübten Applikationsformen wie intravenöse oder intraperitoneale Injektionen dem natürlichen Infektionsmodus ähnelt, kam ANTON (1934) der Zufall zuhulfe. Bei einer Injektion geriet einem Helfer etwas Material ins Auge. Einen Tag später war die Bindehaut gerötet und schmerzhaft. Daraufhin infizierte ANTON 22 Kaninchen, erst durch einfaches Eintropfen in den Konjunktivalsack, dann durch Auftragen einer Bakterienaufschwemmung mit einer Öse, um leichte Verletzungen zu setzen. Innerhalb von 24-48 h entwickelte sich eine eitrige Keratokonjunktivitis.

Die Konjunktiva des Meerschweinchens erwies sich als ebenso empfänglich; ANTON (1934) verfolgte diesen Infektionsmodus jedoch nicht weiter.

Das Kaninchen als Versuchstier wurde noch von einigen anderen Autoren wie GRAY et al. (1948) und FLAMM und ZEHETBAUER (1956) eingesetzt.

Dem Meerschweinchen den Vorzug gaben eine Reihe von Autoren wie URBANECK (1961), LEHNERT (1964), RALOVICH et al. (1972), EMÖDY und RALOVICH (1974) sowie ORTEL (1975). Nach BERGER (1975) ist das Meerschweinchen geeigneter für diesen Test, da es billiger und leichter zu handhaben ist als ein Kaninchen. Das Alter der Tiere ist ohne Einfluß auf die Reaktion, die ohnehin stärker und länger andauernd als beim Kaninchen ist.

Die Methodik reicht vom einfachen Eintropfen einer Keimsuspension (MORRIS und JULIANELLE, 1935) in den Konjunktivalsack bis hin zur vorherigen Scarifizierung der Hornhaut (FLAMM und ZEHETBAUER, 1956), um auch bei geringen Keimmengen bzw. wenig virulenten Listerien eine typische Keratokonjunktivitis zu erzeugen. Zur nötigen Keimmenge sei bemerkt, daß RALOVICH et al. (1972) erst ab 10^6 CFU/ml eines "virulenten" Stammes (Sv 1/2 a, hämolysierend) eine positive Reaktion im Sinne einer Keratokonjunktivitis auslösen konnten.

Einen Zusammenhang zwischen der Pathogenität und dem Hämolyseverhalten eines Stammes sahen RALOVICH et al. (1972), EMÖDY und RALOVICH (1974) sowie ORTEL (1975): die experimentelle Keratokonjunktivitis lasse sich nur mit virulenten Stämmen, die eine β -Hämolyse besitzen, erzeugen, nicht aber mit schwach bzw. avirulenten.

2.2.1.2. Mäusepathogenitätstest

Die FDA (LOVETT et al., 1987) sieht in ihrer Nachweismethode für Listerien u. a. den Mäusetest zum Nachweis der Pathogenität isolierter Listerienstämme vor. Dazu werden fünf Mäuse pro Stamm intraperitoneal mit 0.1 ml einer mit 0.1 %iger Peptonlösung auf etwa 10^{10} CFU/ml eingestellten Nährbouillon beimpft. Je ein pathogener und apathogener Referenzstamm werden mit der gleichen Tierzahl als Kontrolle eingesetzt. Die Mäuse werden über 7 Tage hinweg beobachtet. Pathogene Stämme (*L. monocytogenes*, *L. ivanovii*) töten die Mäuse gewöhnlich innerhalb von 5 Tagen, während die Verabreichung apathogener überlebt wird.

Hier ein kurzer Literaturüberblick über den Mäusepathogenitätstest (nur im Hinblick auf die intraperitoneale Injektion).

Zum diagnostischen Tierversuch benutzte noch DEDIE (1955) die weiße

Maus: er injizierte 0.1 ml einer 18stündigen Serumbouillonkultur i.p.. Die Tiere starben binnen weniger Tage an einer Septikämie und der Erreger ließ sich leicht aus allen Organen isolieren. FLAMM (1955) nahm zur Klärung, ob ein gefundener Keim eine Listerie ist, ebenfalls die weiße Maus als Versuchstier.

Nach i.p. Verabreichung von 0.1-1 ml einer 24-48 h bebrüteten Dextrosebouillonkultur starben die Mäuse innerhalb von 17 h bis 8 Tagen. Er diagnostizierte Listeriose anhand charakteristischer pathohistologischer Veränderungen wie "bakteriell-toxische" Nekrosen im reaktionslosen Leberparenchym bei Mäusen, die innerhalb von 3 Tagen gestorben waren bzw. leukozytär infiltrierte Granulome bei erst später verendeten Mäusen.

In den folgenden Jahren bestimmten viele Autoren die LD₅₀: KAUTTER et al. (1963) erhielten nach i.p. Verabreichung (Swiss Webster Mäuse, 16-20 g) Werte von 10^3 - 3×10^4 CFU.

KHAN et al. (1972) benutzten ältere Mäuse (Schofield strain, 18-22 g, 3-4 Wochen); die LD₅₀ stieg auf 3.5×10^5 bis 4.5×10^6 CFU.

RALOVICH et al. (1972) ermittelten für einen "virulenten" Stamm (Serovar 1/2 a, hämolysierend) eine LD₅₀ $>10^6$ und $<10^7$. Die LD₅₀ des anhämolytischen Stammes (Serovar 4 ab) war $>10^8$ und $<10^9$.

Sie injizierten der weißen Maus (22-25 g) 0.5 ml einer Levinthal-Bouillon-Kultur.

Von KOENIG et al. (1983) ermittelten anhand von weiblichen NMRI/Han-Mäusen (22-28 g, 8-16 Wochen) die LD₅₀ nach i.p. Verabreichung: sie lag für Serovar 4 b bei 10^4 CFU, für 1/2 b bei 10^7 , für 4 d bei 10^{11} , für 6 b (*L. innocua*) bei 10^{12} und überraschenderweise für Serovar 3 a (*L. monocytogenes*) bei 10^{12} .

Einen Zusammenhang zwischen der Pathogenität im Tierversuch und der Hämolyse sah schon WELSHIMER (1968): von 12 aus pflanzlichem Material isolierten Stämmen zeigten zwei Hämolyse; nur sie waren im Mäusetest pathogen. Ebenso verdeutlichen RALOVICH et al. (1972), daß nur der hämolytische Stamm für Mäuse pathogen war. BERGER (1975) betonte, daß nur hämolytische Stämme zum Tod der Mäuse nach 2-4 Tagen führten und die Leber typische kleine, helle Herde zeigte, während die mit anhämolytischen Stämmen beimpften Mäuse keine pathologischen Veränderungen aufwiesen. ORTEL (1975) folgerte aus seinen Versuchen, daß Virulenzkriterien wie Mäusepathogenität immer nur von hämolytischen Stämmen erfüllt wurden.

EMÖDY und RALOVICH (1974) meldeten sogar Zweifel an der Maus als Versuchstier überhaupt an: die LD_{50} für *S. enteritidis* liegt mit 10 Keimen i.p. wohl weit unter der von virulenten Listerien (LD_{50} : 10^6 - 10^7 Keime). Sie folgerten daraus, daß die Maus für Infektionen mit Listerien nicht sehr empfänglich sei.

2.2.1.3. Nachweis der Pathogenität von Listerienstämmen am bebrüteten Hühnerei

Schon PATERSON (1940b) beimpfte 14tägige Hühnerembryonen mit verschiedenen *L. monocytogenes*-Stämmen (bis 1977 wurden alle Listerien-Spezies unter der Bezeichnung "*L. monocytogenes*" zusammengefaßt; SEELIGER, 1981) in die Allantoishöhle (0.1 ml einer 10^{-7} verdünnten, standardisierten Kultur). Er wies an den abgestorbenen Embryonen - keiner lebte länger als 72 h nach der Inokulation - Veränderungen an der Chorioallantoismembran (CAM) nach, sowie an Leber, Herzmuskel und ZNS, die denen natürlicher Listeriose ähneln. Stamm Pirie hingegen tötete die Embryonen zwar ebenfalls ab, zeigte aber keine pathologischen Veränderungen am Embryo, gleichwohl die Listerien in den Organen und Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden konnten. Embryonen, beimpft mit Rauformen, starben auch innerhalb von 6 Tagen nicht ab.

JAEGER und MYERS (1954) studierten die Eigenschaften zweier *L. monocytogenes*-Stämme, die aus menschlichem Material isoliert worden waren. Sie beimpften 10tägige Hühnerembryonen in die Allantoishöhle mit 0.1 ml einer 18stündigen Kultur, die 10^3 - 10^4 Keime enthielt, und sie beobachteten das Absterben der Embryonen innerhalb 24-48 h. Die Veränderungen, die die Impfstelle auf der CAM umgaben, beschrieben sie als pockenähnliche Plaques.

Nach DEDIE (1955) sterben die Embryos binnen 36 h, wenn 0.2 ml Bouillonkultur in die Chorioallantoishöhle geimpft werden. Er bezeichnete das Brutei als guten Nährboden für Listerien. Deswegen empfahl er auch, Bruteier zum Nachweis von Listerien bei keimarmem Ausgangsmaterial zu benutzen bzw. um Stammkulturen in die S-Form zurückzuführen.

DONTENWILL und KNOTHE (1956) führten die Pathogenitätsprüfung zur Abgrenzung von Bakterien der Erysipelothrixgruppe bzw. Corynebakterien durch. Als typische Veränderungen riefen Listerien bis zu stecknadelkopfgroße Knötchen an der CAM sowie areaktive Lebernekrosen, die den bei Frühgeborenen beobachteten Nekrosen der Leber bei Listerieninfektionen ähneln, hervor. Die Autoren beimpften 10tägig bebrütete Hühnereier mit je 0.1 ml einer L. monocytogenes-Kultur (Serotyp 4 b) in fallenden Verdünnungen auf die CAM; dabei starben die Embryonen bis zur Verdünnung 10^{-8} (ca. 50 Keime) innerhalb von 24-96 h ab. Sie beobachteten, daß bei hohen Infektionsdosen der Exitus innerhalb von 24 h nach Impfung eintritt, sich der Absterbeprozess bei geringeren Injektionsdosen jedoch bis zu 96 h verlängert.

RALOVICH et al. (1972) bestimmten die Pathogenität "virulenter" (Serotyp 1/2 a, hämolysierend) und "schwach virulenter" (Serotyp 4 ab, nicht hämolysierend) L. monocytogenes-Stämme nicht nur anhand der Fähigkeit zur Erzeugung einer Keratokonjunktivitis bzw. im Mäusepathogenitätstest, sondern auch am 11tägig bebrüteten Hühnerei durch intravenöse Beimpfung. Die LD_{50} des "virulenten" Stammes lag unter 6×10^2 Keimen, die des "schwach virulenten" unter 3×10^6 .

Dottersackinjektionen ergaben beim "virulenten" Stamm eine LD_{50} von weniger als 6×10^4 Keimen, während der "schwach virulente" Stamm auch in Dosen von 3×10^6 Keimen keinen Embryo abtötete.

Ebenfalls in den Dottersack, aber am 10. Bebrütungstag, impften KAMPELMACHER und van NOORLE JANSEN (1972a) aus den Fäzes klinisch gesunder Personen isolierte L. monocytogenes-Stämme. Alle mit hämolytischen Stämmen infizierten Embryonen starben innerhalb von 5 Tagen; die Injektion nichthämolytischer Stämme wurde überlebt. Sie schlossen daraus, daß die nichthämolytischen Stämme Saprophyten seien.

Auch ORTEL (1975) setzte zur Untersuchung von Stuhlproben weiblicher Laborangestellter eines Institutes Hühnerembryonen ein. Er beimpfte die Allantois 10 Tage bebrüteter Hühnereier mit je 0.1 ml einer verdünnten Keimsuspension (Keimgehalt 2×10^6 , 2×10^5 und 2×10^4), und zwar pro Verdünnungsstufe 2, also insgesamt 6 Eier pro Stamm, die er 48-72 h bei 37°C bebrütete. Acht aus dem Stuhl angezüchtete L. monocytogenes-Stämme der Serotypen 4 a und 2 der Serotypen 4 b (ohne Hämolyse) bewirkten nur

in einem Fall von 48 Ansätzen (Serovar 4 a) bei der Keimverdünnung 10^{-3} das Absterben eines Hühnerembryos. Unter Berücksichtigung von Mäusepathogenitätstest, Keratokonjunktivaltest und Lipaseprüfung konnte er zeigen, daß nur β -hämolsysierende Stämme pathogen sind.

WOOD und WOODBINE (1977) züchteten Keimsuspensionen von *L. monocytogenes* bei verschiedenen Temperaturen, tropften diese in die Luftkammer 18tägig bebrüteter Hühnereier und beurteilten die unterschiedliche Virulenz anhand der Schlupfrate, die meistens abnahm, wenn die Anzüchtungstemperatur der Kultur gesenkt wurde, was sie auf eine unter diesen Bedingungen verstärkte Hämolsinbildung zurückführten.

BASHER et al. (1984b) führten am 15tägigen Embryo die Beimpfung der Allantois durch. Sie folgerten aus ihren Versuchen, daß das Hämolsin einer bei 4 °C bebrüteten *L. monocytogenes*-Bouillonkultur eine höhere Zytotoxizität aufweist als das einer bei 37 °C gezüchteten. Zuvor hatten dieselben Autoren (1984a) den LD_{50} -Wert 15tägiger Hühnerembryonen, der bei den einzelnen Stämmen sehr unterschiedlich war, aufgrund von Injektionen in die Allantois bestimmt. Die dabei lichtmikroskopisch und elektronenoptisch feststellbaren Zellschädigungen in der Milz und auf der CAM führten sie auf ein "lösliches Hämolsin" zurück.

2.2.2. Nachweis der Pathogenität von Listerienstämmen anhand von Zellkulturen

Zum Nachweis der Pathogenität sind in jüngster Zeit auch Zellkulturversuche herangezogen worden.

Schon 1969 fand SIDDIQUE heraus, daß teilweise gereinigtes Hämolsin (partially purified hemolysin) zytotoxisch für den L-M-Stamm von Mäusezellen war.

FARBER und SPEIRS (1987) testeten verschiedene kontinuierliche Zelllinien auf ihre Fähigkeit zur Unterscheidung zwischen pathogenen und apathogenen *Listeria* spp.: Kulturfiltrate bzw. Verdünnungen von hämolsysierenden *L. monocytogenes*- und *L. ivanovii*-Stämmen erwiesen sich als zytotoxisch; *L. innocua*, *L. grayi* und *L. murrayi* zeigten diesen Effekt nicht. Die CHO (Chinese hamster ovary)-Zelllinie erwies sich als die empfänglichste: zytotoxische

Effekte träten bei unverdünnten Bakterienfiltraten schon innerhalb von Minuten auf.

2.2.3. Hämolyseverhalten und Pathogenität der einzelnen *Listerienspezies*

Anschließend wird der Versuch unternommen, das Hämolyseverhalten der einzelnen Spezies in Kombination mit ihrer Pathogenität gerafft darzustellen.

a) *L. monocytogenes* (SEELIGER und JONES, 1986)

ß-Hämolyse: +

CAMP-Test: *Staphylococcus aureus*: +

(*S. aureus*)

Rhodococcus equi: -

(*R. equi*)

Tierversuch:

- Augentest: +

- Mäusetest: $LD_{50} > 1 \times 10^5$ CFU (i.v., erwachsene
holoxenic Swiss Mäuse)
(ROCOURT und SEELIGER, 1983)

Über anhämolysche, apathogene Stämme der Serovare 4 a und 4 b berichten ORTEL (1975), AUDURIER et al. (1980) sowie ROCOURT und SEELIGER (1983). HOF (1984) fand ebenfalls einen anhämolyschen Stamm (Sv 1/2 a, SLCC 53 = NCTC 10357). Dieser löste weder bei einfachen Babymäusen, noch bei mit Dextransulfat behandelten, oder bei Nacktmäusen eine Erkrankung aus. Er bezeichnete diesen Stamm deshalb als "avirulent". Außerdem testete er die R-Form eines hämolyschen *L. monocytogenes*-Stammes: dessen Virulenz bezeichnete er als "intermediate" im Vergleich zur Glattform bzw. der anhämolyschen Variante, da Babymäuse erst bei Anheben der Infektionsdosis der Glattform starben.

b) *L. ivanovii* (SEELIGER et al., 1984)

β-Hämolyse: +

ungewöhnlich stark ausgeprägtes Phänomen der Doppel- und gelegentlich Mehrfachzonenhämolyse (SEELIGER et al., 1982)

CAMP-Test: *S. aureus*: -

R. equi: +

Tierversuch:

- Mäusetest: Erwachsene NMRI-Mäuse sterben innerhalb von 3 Tagen, wenn mehr als 10^7 Keime i.v. injiziert werden. 10^5 Keime hingegen werden überlebt. SEELIGER et al. (1982) zeigten damit, daß Stämme der Serovar 5 zwar eine gewisse Virulenz besitzen, die aber deutlich geringer ist als die anderer Serovarietäten.

Es sind auch einige Stämme aus dem Material kranker Menschen isoliert worden (SEELIGER et al., 1982). Bei Tieren wurde bisher hauptsächlich über Schafaborte berichtet (IWANOW, 1962; HUNTER, 1973; MACLEOD und WATT, 1974; DENNIS, 1975), SEELIGER et al. (1984) halten es deshalb für möglich, daß die Basis der Pathogenität von Sv 5 eine andere als die von *L. monocytogenes sensu stricto* ist. Dafür könnte auch sprechen, daß Mäuse, die eine Infektion mit *L. ivanovii* überlebt hatten, keine erhöhte Resistenz gegen eine *L. monocytogenes*-Infektion aufwiesen, wohl aber gegen eine Reinfektion mit *L. ivanovii* (HOF und HEFNER, 1988).

c) *L. seeligeri*

β-Hämolyse: schwach (SEELIGER und JONES, 1986)

CAMP-Test: *S. aureus*: + (ROCOURT und Grimont, 1983)

R. equi: -

Tierversuch:

- Mäusetest: Spezies gilt als apathogen (ROCOURT und SEELIGER, 1983)
 $LD_{50} > 10^8$ CFU i.v. (erwachsene holoxenic Swiss Mäuse)

Ein Fall menschlicher Listeriose durch *L. seeligeri* ist allerdings nachgewiesen (ROCOURT et al., 1985). Dabei handelte es sich um einen Patienten ohne nachweisbare Immunschwäche, der an einer akuten, eitrigen Meningitis erkrankte. Dieser Stamm zeigte im Tierexperiment einige Besonderheiten: er überlebte im Tier nur kurze Zeit, bildete eine mäßige Immunität gegenüber Zweitinfektionen mit *L. monocytogenes*, vermehrte sich aber in Mäusen nicht. Selbst Babymäuse erkrankten nicht.

Es wurden noch zwei weitere Stämme aus dem Hirn eines Schafes und eines Hasen isoliert, so daß eine eventuelle Pathogenität dieser Spezies nach ROCOURT und SCHRETTENBRUNNER (1985) nicht ganz ausgeschlossen werden kann.

d) *L. innocua* (SEELIGER, 1981)

ß-Hämolyse: -

PONGRATZ und SEELIGER (1984) entdeckten eine Zone vergrünender Hämolyse bei Kultivierung auf Schafblutagar mit Glucosezusatz. Hierbei handelte es sich aber um eine durch starke metabolische Säurebildung hervorgerufene Lyse der Erythrozyten (Säurehämolyse).

Tierversuch:

- Augentest: -

- Mäusetest: - (10^9 CFU i.p. apathogen)

PATOCKA et al. (1979) gelang es aber, eine lokalisierte Encephalitis bei Saugmäusen durch Stamm Welshimer nach intrazerebraler Inokulation (3×10^4 bis 3×10^6 CFU) mit eindeutiger Keimvermehrung nachzuweisen.

e) *L. welshimeri* (ROCOURT und GRIMONT, 1983)

ß-Hämolyse: -

Tierversuch:

- Mäusetest: Spezies gilt als apathogen

($LD_{50} > 10^8$ CFU)

Dies bestätigten auch Versuche von KLUGE und HOF (1986): sie blockierten die Makrophagen erwachsener NMRI-Mäuse mit Dextran-sulfat. Selbst dann überlebten die Mäuse i.v.-injizierte Keim-mengen von 10^7 CFU. Ebenso erwiesen sich 5 Tage alte Babymäuse resistent gegen *L. welshimeri*.

Insgesamt betrachtet, kann man die pathogene Bedeutung von *L. welshimeri* noch nicht genau beurteilen, da noch zu wenig pathogenetische Studien vorliegen. Nach ROCOURT und SEELIGER (1985) kommt diese Spezies zwar vorwiegend in der unbelebten Natur vor, wird aber gelegentlich auch in tierischen Materialien gefunden.

f) *L. grayi* (LARSEN und SEELIGER, 1966)

β-Hämolyse: - (SEELIGER und JONES, 1986)
schwach positiv (LARSEN und SEELIGER,
1966)

Tierversuch:

- Augentest: -

- Mäusetest: -Spezies gilt als apathogen (SEELIGER und
JONES, 1986)

g) *L. murrayi* (WELSHIMER und MEREDITH, 1971)

β-Hämolyse: -

Tierversuch:

- Augentest: -

- Mäusetest: 16-18 g schwere Mäuse erkrankten nach i.p.
Injektion von 10^9 CFU sofort, einige starben.
20-22 g schwere Mäuse überlebten diese Dosis.
 10^8 CFU überlebten auch die leichteren Mäuse.

h) *L. denitrificans* (SEELIGER und JONES, 1986)

β-Hämolyse: -

Tierversuch:

- Augentest: -

- Mäusetest: pathogen nach i.p. Verabreichung

2.2.4. Hämolysin als Virulenzfaktor

Mit RALOVICH (1988) sollte man sich erst einmal verdeutlichen, was "Virulenz" überhaupt bedeutet: er hält einen Listerienstamm dann für virulent, wenn er die Fähigkeit zu Adhäsion, Penetration, Induktion von Phagozytose bzw. Endozytose besitzt und sich, abgesehen von noch anderen Effekten, in der Zelle vermehren kann.

Seit MACKANESS (1962) ist nun bekannt, daß *L. monocytogenes* sich intrazellulär vermehrt. Er konnte 10 min nach intravenöser Injektion (Maus) einer subletalen Dosis von *L. monocytogenes* etwa 90% der Keime aus Leber und Milz isolieren; die Makrophagen des RES hatten sie phagozytiert. In beiden Organen konnte er eine Vermehrung der Keime bis hin zum dritten Tag post infectionem nachweisen. Trotzdem, die Faktoren bzw. der Mechanismus, die das intrazelluläre Wachstum von *L. monocytogenes* erlauben und schließlich zur Zerstörung der Makrophagen führen, sind noch nicht hinreichend geklärt.

Unter den Faktoren, die für die Virulenz pathogener Stämme verantwortlich sein können, spielt das Hämolysin sicher eine besondere Rolle: alle Stämme, die bisher aus natürlichen Infektionen isoliert wurden, zeigten Hämolyse und waren im Tierversuch pathogen (GROVES und WELSHIMER, 1977; ROCOURT et al., 1982).

Bei ORTEL (1975) und HOF (1984) finden sich Angaben über nicht-hämolisierende *L. monocytogenes*-Stämme, die sich im Tierversuch apathogen verhielten und auch zu keiner Immunität führten (HOF und HEFNER, 1988).

Nachfolgend eine kurze Charakterisierung des Hämolsins: es ist anscheinend ein hitzelabiles, antigenwirksames, extrazelluläres Protein; seine lytische Aktivität wird durch reduzierende Agentien (z. B. Cystein) verstärkt und durch Oxidation unterdrückt (NJOKU-OBİ et al., 1963; JENKINS et al., 1964), ebenso wie durch Cholesterin (KINGDON und SWORD, 1970b) oder Antistreptolysin O (anti-SLO) (JENKINS et al., 1964). Diese Eigenschaften und sein cardiotoxischer Effekt (KINGDON und SWORD, 1970b; SIDDIQUE und COOPER, 1969) ähneln sehr dem Streptolysin O (SLO) (HALBERT, 1970) und lassen vermuten, daß es zur Gruppe der sulfhydryl(SH)-aktivierten Bakterientoxine gehört, deren Prototyp SLO ist (ALOUF, 1980).

Die Angaben über das Molekulargewicht (MG) schwanken zwischen 170 000 (JENKINS und WATSON, 1973) und 10 000 (SIDDIQUE et al., 1974);

JENKINS und WATSON (1973) fanden in diesem Zusammenhang noch eine lipolytische Komponente mit einem Molekulargewicht von 52 000. Das MG von SLO und ähnlichen gereinigten Toxinen liegt bei etwa 60 000 (ALOUF und GEOFFROY, 1984). KHAN et al. (1973) beschrieben sogar eine hämolytische Lecithinase.

PARRISIUS et al. (1986) berichteten über ein partiell gereinigtes SLO-ähnliches Hämolysin (MG 55-60 000), gebildet von *L. ivanovii*. Mit Kaninchenantiserum gegen dieses Hämolysin entdeckten sie bei *L. monocytogenes* ein Hämolysin mit MG 60 000, das sie α -Listeriolysin nannten. Ein anderes, das sie mit diesem Antiserum nicht nachweisen konnten, nannten sie β -Listeriolysin.

GEOFFROY et al. (1987) reinigten und charakterisierten ein Hämolysin von *L. monocytogenes* mit einem MG von 60 000, das sie Listeriolysin O nannten, da es wie SLO die klassischen, oben angeführten Eigenschaften anderer sulphydrylaktivierter Bakterientoxine besitzt. Die LD₅₀ von Listeriolysin O ermittelten sie mit ca. 0.8 μ g pro Maus.

Das Hämolysin von *L. ivanovii*, über das PONGRATZ (1982) ausführlich berichtet, ist nach DATTA et al. (1988) nicht mit dem Hämolysin von *L. monocytogenes* identisch; es hybridisierte nämlich nicht mit einer DNA-Probe von *L. monocytogenes*, einem Fragment des β -Hämolyphins, bestehend aus 500 Basenpaaren.

Als dritte Spezies bildet auch *L. seeligeri* ein Hämolysin, über das aber noch nichts Näheres bekannt ist. GOEBEL et al. (1988) demonstrierten, daß diese zwar hämolytische, dennoch aber apathogene Art im Western-Blot mit Antikörpern gegen Listeriolysin aus *L. ivanovii* und Streptolysin keine Kreuzreaktionen zeigte.

ARMSTRONG und SWORD (1966) infizierten Mäuse i.p. mit *L. monocytogenes*; nach 72 h fanden sie die Listerien in Phagosomen von Mäusemilzmakrophagen. Die Membranen dieser Vakuolen wurden dann zerstört, gefolgt von Schädigungen des Cytoplasmas. Die Autoren vermuteten, daß das Hämolysin der lytische Faktor sein könnte. BERCHE et al. (1988) beobachteten bei anhämolysitischen Varianten keine Zerstörung der Vakuolen.

Man mag sich das Bild der intrazellulären Vermehrung vielleicht wie folgt vorstellen: nach Invasion wird *L. monocytogenes* schnell von den Makrophagen des RES der Leber und Milz phagozytiert (MACKANESS, 1962). In dieser eisenarmen Umgebung (BULLEN, 1981) in den Phagolysosomen wird nun vermehrt Hämolysin gebildet (COWART und FOSTER, 1981), das sich dann irreversibel an das Cholesterin der Membranen bindet (GEOFFROY, 1987; SCHEFFER et al., 1988). Dies führt nach KINGDON und SWORD (1970a) zur Zerstörung der intrazellulären Membranen und das Hämolysin gelangt ins Cytoplasma. Ferritin-Eisen und andere Formen, die durch die Zerstörung der Lysosomen frei werden, führen zu einem verstärkten Wachstum (SWORD, 1966) der Listerien. Nach Aufbrauchen der Eisenreserven resultiert daraus eine verstärkte Hämolysinbildung, die dann schließlich zu fortschreitender Zellzerstörung der befallenen Gewebe führt (KINGDON und SWORD, 1970a). Nach neuesten Untersuchungen (BERCHE et al., 1987) soll dieses intrazelluläre Wachstum eine Voraussetzung für die (in vivo) T-zell-vermittelte Immunität sein.

Einen weiteren Hinweis darauf, daß Hämolysin das pathogene Prinzip sein könnte, lieferten GAILLARD et al. (1986). Sie bauten durch "transposon mutagenesis" eine anhämolytische Variante von *L. monocytogenes* (nach neueren Informationen produzierte diese Mutante ein inaktives Hämolysin (BERCHE et al., 1987)). Diese Änderung in der Hämolysinproduktion war mit einem Virulenzverlust gekoppelt, der sich in einer raschen Eliminierung aus Leber und Milz, d. h. der Unfähigkeit zur Vermehrung, und einer hohen LD₅₀ (10^{9-6} CFU bei i.v. Injektion der Maus) äußerte.

2.3. Hitzeresistenzverhalten von Listerien mit besonderer Berücksichtigung der Milchpasteurisierung

Soweit zurück, wie die Entdeckung des Keimes *L. monocytogenes* im Jahre 1926 durch MURRAY et al. reichen auch die Versuche zur Erforschung seiner Hitzeresistenz, die sich anfänglich aber meist noch nicht mit der Frage der Milchpasteurisierung beschäftigten. Die Tab. 2 und 3 zeigen die verschiedenen Ergebnisse und Untersuchungstechniken bis zum Jahre 1979:

SEELIGER und LINZENMEIER (1953), DEDIE (1955), BISPING (1957) und AMTSBERG et al. (1969) hielten die Pasteurisierungsverfahren zur Abtötung von in der Milch vorhandenen Listerien für ausreichend. Auf der anderen Seite stehen GORET und OUDAR (1965) und SEELIGER (1961), die die Langzeitpasteurisierung, POTEL (1953/54, 1955), der die Kurzzeiterhitzung und HOF et al. (1986), die sogar die Hoherhitzung für unzureichend erachteten.

Doch worin liegen nun diese einander widersprechenden Aussagen begründet?

ÖZGEN (1951), POTEL (1955) und BISPING (1957) führten dies auf unterschiedliche Versuchstechniken zurück, was DEDIE und SCHULZE (1957) und SCHULZE (1957) mit ihren Versuchen zu Abtötungszeiten von Listerien in Röhrchen mit verschiedenen Weiten demonstrierten. Bei Verwendung von Reagenzgläsern mit einer lichten Weite von 14 mm wurden 14 min bei 60 °C und 40 s bei 85 °C zur Abtötung benötigt. Demgegenüber starben die Listerien, wenn Glaskapillaren mit 0.3 mm lichter Weite eingesetzt wurden, bei 60 °C schon nach 65 s und bei 80 °C nach 5 s ab. Ihnen erschien die Kapillarmethode als geeignet zur Erforschung der Hitzeresistenz; die übliche Hoherhitzung der Milch ist ihrer Meinung nach ausreichend, während sie den verbleibenden Sicherheitsspielraum der Kurzzeiterhitzung für zu gering einschätzten.

BEARNS und GIRARD (1958) führten ihre Versuche in 20 X 150 mm großen Röhrchen mit Schraubverschluß durch. Sie kamen zu dem Ergebnis, daß Listerien die Langzeitpasteurisierung überleben, sobald ihre Anzahl 5×10^4 CFU/ml Milch übersteigt. Ihre errechneten $D_{61.7\text{ °C}}$ -Werte reichten von 9.5 bis 10.8 min. Auch stellten sie weder bemerkenswerte Unterschiede in der Hitzeresistenz verschiedener Stämme fest, noch beobachteten sie einen Schutzeffekt der Milch im Vergleich zu Wasser als Erhitzungsmedium.

Erneut ins Gespräch kam die Frage nach der Zuverlässigkeit der Milchpasteurisierung erst im Jahre 1983: 49 Menschen erkrankten in Massachusetts an Listeriose, 14 von ihnen starben.

Epidemiologisch wurde ein Zusammenhang zum Verzehr pasteurisierter Milch hergestellt; die Überprüfung der Pasteurisierungsanlagen hatte aber keinen Hinweis auf etwaige Fehler ergeben und auch eine anschließende Kontamination konnte mit ziemlicher Sicherheit ausgeschlossen werden (FLEMING et al., 1985). Diesem Ausbruch folgte von Januar bis Juni 1985 in Kalifornien ein zweiter, der mit dem Verzehr von "Mexican-style cheese" verbunden war (JAMES et al., 1985). Zusätzliche Untersuchungen ergaben aber, daß nicht alle Milch, die für die Herstellung des Käses verwendet worden war, auch pasteurisiert worden war (DONNELLY, 1988).

Im Folgenden (Tab. 4) ein kurzer Überblick über die Arbeiten der Autoren, die die Pasteurisierung der Milch für ausreichend hielten.

BRADSHAW et al. (1985) erhitzen sterile Vollmilch, die mit 1×10^5 Listerien/ml versetzt war, in versiegelten Glasröhrchen (13 X 100 mm) im Wasserbad bei verschiedenen Temperaturen und erhielten für 71.7°C einen D-Wert von 0.9 s. Daraus folgerten sie, daß mehr als 10^{15} Listerien/ml Rohmilch vorhanden sein müßten, um die Pasteurisierung zu überleben. Um zu testen, ob die Hitze-resistenz von Listerienstämmen eine konstante, d. h. unveränderbare Eigenschaft ist, unterwarfen sie schon erhitze Populationen von Stamm Scott A erneuten Hitzetests, konnten aber kein unterschiedliches Verhalten ausfindig machen.

DONNELLY und BRIGGS (1986) untersuchten den Einfluß der Milchezusammensetzung (sterile Vollmilch, Magermilch, Milch mit 11 % fettfreier Trockensubstanz (11 % NFMS)) durch Erhitzung der Proben in verschlossenen Glasampullen, ermittelten aber bei allen drei Erhitzungsmedien etwa gleiche D-Werte für 62.7°C , die um eine Minute lagen.

TERPLAN et al. (1986) stellten bei Erhitzung von künstlich infizierter, pasteurisierter Milch (9×10^4 bzw. 1×10^5 CFU/ml) in einem Kurzzeitplattenerhitzer schon bei 63°C für 30 s kein Überleben mehr fest; FARBER et al. (1987) konnten diese Ergebnisse anhand Erhitzung natürlich und künstlich kontaminierter Milch bestätigen.

Den Einfluß der Erhitzungsmethodik auf das Hitzeresistenzverhalten war in folgenden zwei Arbeiten deutlich herausgestellt:

BECKERS et al. (1987) zeigten, daß eine im offenen Röhrchen durchgeführte Erhitzung (80°C , 1 min) die Listerien nicht abtötet. Auf der anderen Seite konnten die Listerien (1.8×10^4 CFU/ml) nach Erhitzung für 20 s für 67°C nicht mehr nachgewiesen werden, wenn anstelle von Röhrchen undurchlässige Plastikbeutel, die vollständig im Wasserbad versenkt werden konnten, verwendet wurden. Sie halten die Pasteurisierung deshalb für ausreichend.

Auch DONNELLY et al. (1987) erkannten den Nachteil der Erhitzung in Reagenzröhrchen ("test tubes"): sie erklärten das Überleben von Listerien in diesen Versuchen (Tab. 5) damit, daß einerseits Keime die Wand des Röhrchens bedecken, die oberhalb des Wasserspiegels liegt und andererseits wiesen sie auf die Gefahr von verspritzten Keimen im Deckel bzw. die Möglichkeit der Kondensation hin, wenn der Verschluß des Röhrchens über der Oberfläche des Wasserbades liegt. Deshalb gaben sie völlig geschlossenen Glasreaktionsgefäßen, die sie ganz unter die Wasseroberfläche versenken konnten, den Vorzug und kamen aufgrund dieser Ergebnisse wie auch BRADSHAW et al. (1985) zu dem Schluß, daß Listerien durch die Pasteurisierung vollständig abgetötet werden.

Für nicht ausreichend hingegen sahen DOMINGUEZ RODRIGUEZ et al. (1987) die Pasteurisierung an. Auch FERNANDEZ-GARAYZABAL et al. (1986) konnten in nach dem "high-temperature, short-time"-Verfahren (78°C , 15 s) erhitzter Milch noch Listerien nachweisen; fehlerhafte Pasteurisierung bzw. spätere Kontamination schlossen sie aus.

Der Ausbruch im Jahre 1983 in Massachusetts, bei dem die entsprechende Milch keiner "clarification" (Zentrifugation und Filterung) unterworfen, sondern nur gefiltert worden war, so daß die Leukozyten nicht entfernt worden waren, warf die Frage auf, ob Listerien nicht vielleicht intrazellulär im Leukozyten eine erhöhte Hitze-resistenz hätten (FLEMING et al., 1985). BARZA (1985) erklärt dies mit einem Schutz der Listerien durch die intrazelluläre Lage vor antimikrobiellen Substanzen der Milch, wie Gamma-Globulinen, Lysozym und Peroxidase.

BUNNING et al. (1986) (Tab. 6) gingen als erste dieser These nach: sie verglichen die D-Werte frei suspendierter L. monocyto-

genes-Keime ($D_{71.7}^{\circ\text{C}}$ -Wert betrug 1.6 s) mit denen von in Mäuseperitonealphagozyten eingeschlossenen Listerien. Da der $D_{71.7}^{\circ\text{C}}$ -Wert letzterer mit 1.9 s nicht wesentlich höher lag, kamen sie zu dem Schluß, daß Listerien trotz eines gewissen Schutzes im Phagozyten keine erhöhte Hitzeresistenz aufweisen.

DOYLE et al. (1987) hingegen erhielten bei unterschiedlichen Versuchsbedingungen völlig andere Ergebnisse. Sie infizierten Kühe mit Listerien und erhitzen deren Milch, die etwa 10^5 bis 10^6 Zellen/ml, eine sehr hohe Gesamtkeimzahl ($>1.0 \times 10^5$ CFU/ml), $<1.2 \times 10^2$ bis 4.8×10^4 phagozytierte Listerien/ml - bei einer "Befallsrate" von 0 bis 9.2 Listerien pro polymorphkernigem Leukozyt (PMNL) - enthielt, in einem high-temperature, short-time-Plattenerhitzer. Bei 71.7 bis 73.9 $^{\circ}\text{C}$ für 16.4 s konnten sie noch Überlebende nachweisen. Erst 76.4 bis 77.8 $^{\circ}\text{C}$ für 15.4 s töteten die Listerien ab. Sie folgerten daraus, daß die HTST-Pasteurisierung (71.7 $^{\circ}\text{C}$, 15 s) zur Abtötung von Listerien nicht ausreicht. Auch beobachteten sie, wenn Milch bei 4 $^{\circ}\text{C}$ gelagert wird, eine Abnahme von intrazellulär gelegenen Listerien am dritten Tag sowie den vollständigen Zerfall der PMNL am vierten Tag.

Dies und die Vermutung, daß wieder "freigelassene" Listerien eine verstärkte Hitzeempfindlichkeit aufweisen könnten, veranlaßte sie zu dem Vorschlag, die Milch vor der Pasteurisierung einige Tage kühl zu lagern.

BUNNING et al. (1988) untersuchten die Hitzeresistenz von frei suspendierten und phagozytierten (endotoxin-induzierte, bovine PMNL) *L. monocytogenes*-Keimen mit versiegelten Röhrchen und einem "slug flow heat exchanger" bei Temperaturen zwischen 57.8 und 74.4 $^{\circ}\text{C}$. Ihre Versuche ergaben für phagozytierte Listerien (10^4 Zellen/ml Milch, 26.1 ± 19.3 Listerien/PMNL, Infektionsrate 43 %) einen $D_{71.7}^{\circ\text{C}}$ -Wert von 4.1 s, 2.7 s für frei suspendierte. Ihrer Meinung nach erhöht die intrazelluläre Position von *L. monocytogenes* die Hitzeresistenz nicht wesentlich, so daß die Langzeitpasteurisierung (62.8 $^{\circ}\text{C}$ für 30 min) bzw. die HTST-Pasteurisierung (71.7 $^{\circ}\text{C}$ für 15 s) zur Abtötung von Listerien ausreichen.

Tabelle 2: Untersuchungen über die Hitzeresistenz von Listerien (1926-1957)

Autor(en)	Hitzebehandlung Temperatur (°C)	Zeit	Überleben	Erhitzungsmedium (CFU/ml)	Methode
MURRAY et al. (1926)	58-59 58-59	10-30 min 10 min	- -	"broth" 0.85 %ige NaCl-Lsg.	Wasserbad
BARBER (1939)	55 55	30 min 60 min	+ -	Anwendung von "feuchter Hitze"	
ZELLER (1949)	50 60	120 min 10 min	+ -	Serumbouillonkultur	Ampullen im Wasserbad
ÖZGEN (1951)	60 60 100 100	-12 min 15 min 45 s 60 s	+ - + -	Bouillonkultur	Röhrchen im Wasserbad
POTEL (1950/51)	80	"rasche Abtötung"		keine Angaben	
SCHOOP (1951)	60	10 min	-	in Kultur gezüchtete Keime	
ZINK et al. (1951)	60 100 100	10 min 5 min 10 min	+ + -	0.5 x 10 ⁹ > Keime in "broth"-Kultur	Wasserbad

Tabelle 2: Fortsetzung

SEELIGER und LINZENMEIER (1953)	80	>10 s	-	keine Angaben
POTEL (1953/54)	80	5 min	+	keine Angaben
DEDIE (1955)	65 und 75 85	10 s 15 s 1 s	+ - -	beimpfte Vollmilch (steril) Glaskapillaren Ø 0.3 mm im Wasserbad
STENBERG und HAMMÄINEN (1955)	65 73-75 75 80	5 min 10-30 s 2 min 3-5 s	- + - -	Milch und Bouillonkulturen
DEDIE und SCHULZE (1957)	60 80-85	14 min 60-40 s	- -	hitzebehandelte Vollmilch (90 °C) 1-3 x 10 ⁸ Reagenzgläser Ø 14 mm im Wasserbad
SCHULZE (1957)	60 65 70 75 80 85	65 s 35 s 20 s 10 s 5 s 1 s	- - - - - -	1-3 x 10 ⁴ Glaskapillaren Ø 0.3 mm im Wasserbad

Tabelle 3: Untersuchungen über die Hitze­resistenz von Listerien (1958-1979)

Autor(en)	Hitzebehandlung Temperatur (°C)	Zeit	Überleben	Erhitzungsmedium (CFU/ml)	Methode
JENZTSCH (1958)	100	25 s	-	Bouillonkultur	Wasserbad
BEARNS und GIRARD (1958)	61.7	D-Wert 9.5-10.8 min		sterile Magermilch	Röhrchen mit Ø 20 mm im Wasserbad
GORET und OUDAR (1965)	55 60 75 85	30 min 60 min 12 min 15 min 10 min 1 min	+ - + - - -	Keime in Milch	"feuchte Hitze"
IKONOMOV und TODOROV (1967)	68 72 72	10 min 20 s 20 s	- - +	beimpfte Kuh- und Schafmilch beimpfte Kuhmilch beimpfte Schafmilch	tubulärer Pasteurisierer
				> 30 X 10 ⁶ CFU/ml	

Tabelle 3: Fortsetzung

IKONOMOV (1969)	70	20 s	-	beimpfte Schafmilch	tubulärer
	72	20 s	-		Pasteurisierer
	70	>60 s	-		"test-tube"
	72	60 s	-		Ø 16 mm
OBIGER (1976)	71	23.4 s	-	beimpfte Magermilch	Röhrenerhitzer
STAJNER et al. (1979)	71	42 s	+	beimpfte Kuhmilch	keine Angaben
	74	42 s	+		
	85	15 s	-	5 x 10 ⁸	
	95	5 s	-		

Tabelle 4: Untersuchungen (seit 1985) über die Hitzeresistenz von *L. monocytogenes*;
D-Werte und Zeit-Temperaturbeziehungen für die Inaktivierung

Autor(en)	Temperatur (°C)	D-Wert/ Zeit	Erhitzungsmedium	CFU/ml	Methode
BRADSHAW et al. (1985)	52.2-74.4 71.7	28 min-0.7 s 0.9 s	rohe Vollmilch	1 X 10 ⁵	verschlossene Boro- silikatglasröhrchen Ø 13 mm / slug flow heat exchanger
BUNNING et al. (1986)	52.2-71.7	D _{71.7} -Wert 1.3-1.6 s	rohe Vollmilch	6.9 X 10 ³ -6.0 X 10 ⁶	slug flow heat ex- changer/ versiegelte Glaseröhrchen
DONNELLY und BRIGGS (1986)	62.7	1 min	sterile Vollmilch, Magermilch, 11% NFMS	1 X 10 ⁸	verschlossene 2ml- Glasampullen
TERPLAN et al. (1986)	63	30 s: kein Überleben	pasteurisierte Vollmilch	1 X 10 ⁵	Kurzzeitplatten- erhitzer
BECKERS et al. (1987)	67 70	20 s: kein Überleben 10 s: kein Überleben	Tryptose broth	10 ³ -10 ⁵	verschlossene Plastikbeutel 5 X 5 cm

Tabelle 4: Fortsetzung

BRADSHAW et al. (1987)	79.4	0.5 s	"heavy cream", "ice cream mix"	1 X 10 ⁵	(s.1985)
DONNELLY et al. (1987)	62	0.1-0.4 min	sterile Vollmilch 11% NFMS	10 ⁶⁻¹⁰ ⁷	verschlossene 2ml- Glaspullen
FARBER et al. (1987)	>67.5	16 s: kein Überleben	rohe Vollmilch, natürlich kontam. Sammelmilch	10 ⁴	Plattenerhitzer
BUNNING et al. (1988)	71.7	2.7 s	sterile Vollmilch	10 ⁶	verschlossene Röhren und "slug flow heat exchanger"

Tabelle 5: Untersuchungen (seit 1985) über die Hitze-resistenz von *L. monocytogenes*; Versuche mit überlebenden Listerien

Autor(en)	Temperatur (°C)	D-Wert/ Zeit	Erhitzungsmedium	CFU/ml	Methode
BECKERS et al. (1987)	80 70	1 min: Überleben 15 min: Überleben	Tryptose broth	10^3 - 10^5	offene Röhrchen
DOMINGUEZ et al. (1987)	72 63 72.5	15 s: Überleben 228 s 1.8 s	natürlich kontam. Rohmilch sterile Milch	 10^9	Kapillaren, mit dem Bunsenbrenner ver- schlossen Erlenmeyerkolben
	72.5 74	S* : 1.9 s S** : 1.38 s S* : 1.59 s S** : 1.43 s	sterile Milch	10^7 10^7	zwei Stahlserpenti- nen (S ₁ ;S ₂)
DONNELLY et al. (1987)	72,82,92	30 min: Überleben	sterile Vollmilch 11 % NFMS	5 X 10^6	offene Glasröhrchen

*) Serpentine 1: Wandstärke 0.4 mm; InnenØ 1.0 mm

**) Serpentine 2: Wandstärke 0.2 mm; InnenØ 0.75 mm

Tabelle 6: Untersuchungen über die Hitzeresistenz von phagozytierten L. monocytogenes-Keimen

Autor (en)	Temperatur (°C)	D-Wert/ Zeit	Ernährungsmedium/ Zell- und Keimgehalte	Methode
DONKER-VOET (1962)	59 62.3	15 s: Überleben 15 s: kein Überleben	natürlich kontamin. Rohmilch 1-5 X 10 ⁶ PMNL/ml 10 ³ -10 ⁵ CFU/ml	Plattenerhitzer
BUNNING et al. (1986)	52.2-68.8	D _{71.7} -Wert 1.9 s (extrapoliert)	rohe Vollmilch Mäuseperitonealphagozyten 1.2 X 10 ⁴ -9.0 X 10 ⁵ CFU/ml phagozytiert	verschlossene Glasröhrchen
DOYLE et al. (1987)	71.7-73.9 76.4-77.8	16.4 s: Überleben 15.4 s: kein Überleben	rohe Vollmilch von Kühen, mit L. m. infiziert 1.2 X 10 ² -4.8 X 10 ⁴ CFU/ml phagozytiert	HTST-plate heat exchanger
BUNNING et al. (1988)	62.8 71.7	53.8 s 4.1 s	10 ⁶ CFU/ml phagozytiert/ bovine Phagozyten	verschlossene Glasröhrchen slug flow heat exchanger

2.4. Acriflavin - eine Selektivsubstanz in der Listerien-diagnostik

Da die Isolierung von Listerien aus mischinfiziertem Untersuchungsmaterial durch die in kultureller Hinsicht sehr ähnlichen Enterokokken (Streptokokken der Serogruppe D) erschwert wird, erwies sich der Einsatz bestimmter Acridinfarbstoffe, meist in Kombination mit einem oder mehreren anderen Selektivstoffen, zu deren Hemmung als sehr geeignet. Tab. 7 zeigt einen gestrafften Überblick über die zur Zeit angewandten bzw. vorgeschlagenen Listerienanreicherungsmedien im Hinblick auf die zugesetzten Selektivsubstanzen.

Schon BOCKEMÜHL et al. (1971) berichteten über feste Selektivnährböden mit Acridinfarbstoffen zur Isolierung von *L. monocytogenes*. Ebenso RALOVICH et al. (1971): sie wiesen gute Erfolge beim Einsatz von Trypaflavin (50 mg/l) in Kombination mit Nalidixinsäure (50 mg/l) in festem Nährboden (5 %iger Serumagar) auf. KAMPELMACHER und van NOORLE JANSEN (1972b) gefolgt von ORTEL (1972), der 45 mg/l Trypaflavin einsetzte, legten die Vorteile des Nalidixinsäure-Trypaflavin-Agars dar.

BOCKEMÜHL et al. (1974) setzten Acridinfarbstoffe (10 mg/l) sowie Nalidixinsäure (40 mg/l) einem Listerien-Transport-Anreicherungsmedium zu und erprobten dessen anreichernde und selektive Wirkung mit Erfolg an natürlich wie auch an künstlich infizierten menschlichen Stuhlproben.

Acriflavin (Synonym: Trypaflavin) stellt chemisch gesehen eine Mischung aus den Hydrochloriden von 3,6-Diamino-10-methylacridiniumchlorid und 3,6-Diaminoacridin dar.

Es inhibiert selektiv die in-vivo-Transkription mitochondrialer DNA (FUKUHARA und KUJAWA, 1970). An Mitochondrien von Rattenlebern wurde von MEYER et al. (1972) eine Hemmung der RNA-Synthese in vitro beobachtet.

Studien von BEUMER (BECKERS, 1988) zeigten aber, daß 15 mg/l Acriflavin (die in der FDA-Anreicherungsbouillon eingesetzte Konzentration) die Vermehrung einiger Stämme der Serovarietät 4 b hemmen.

Tabelle 7: Anreicherungsmedien für Listerien im Hinblick auf deren Selektivsubstanzen

Bezeichnung des Mediums	Selektivsubstanzen:			
	Acriflavin (mg/l)	Nalidixinsäure (mg/l)	Cycloheximid (mg/l)	Andere (g/l)
Enrichment broth (EB) (s. a. LOVETT et al., 1987)	15 (15)*	40 (40)	50 (50)	
Listeria Broth (LB I, (II)) (s. a. McCLAIN und LEE, 1988)	12 (25)	20 (20)		
Merck 10985 (s. a. ASPERGER, 1988)	10			37.5 Kalium- thiocyanat
Fraser-Broth (s. a. FRASER und SPERBER, 1988)	12	20		3 Lithium- chlorid
Trypaflavin-nalidixic acid cycloheximid-broth (TNCH) (s. a. BECKERS et al., 1987)	10	40	50	

*() Konzentration in der Sekundärüberimpfung

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1. Pathogenitätstest am bebrüteten Hühnerei

3.1.1. Medien und Reagenzien

-Schrägagar: Tryptone Soya Broth (Oxoid CM 129)	30 g
Agar Nr. 1 (Oxoid L 11)	12 g
Aqua dest.	1000 ml

-Kulturmedium:

Tryptone Soya Broth (Oxoid CM 129)	30 g
Yeast Extract (Oxoid L 21)	6 g
Aqua dest.	1000 ml

-Modifizierter McBride-Agar (LOVETT et al., 1987):

Basisnährboden:

Phenylethanolagar (Difco 0504-01-0)	35.5 g
Glycin Anhydrid (Sigma G 7251)	10 g
Lithiumchlorid (Sigma L 0505)	0.5 g
Aqua dest.	1000 ml

supplementiert mit:

Cycloheximid (Sigma C 6255)	200 mg/l
-----------------------------	----------

-Blutagar: Blood agar base Nr. 2 (Oxoid CM 271)	40 g
Aqua dest.	1000 ml

zufügen von:

defibriniertem, sterilem Schafblut (Oxoid FSR 1055)	70 ml/l
--	---------

-Ringerlösung:

Ringer solution (Oxoid BR 52)	1 Tabl.
Aqua dest.	500 ml

3.1.2. Material

-Bruteier: Firma Bayerische Vermehrungsbetriebe,
8051 Gut Heinrichsruh

Die zum Pathogenitätstest eingesetzten Kulturen waren:

- a) 22 Referenzstämme (Tab. 8),
- b) 86 Stämme aus in- und ausländischen Käsen (L. monocytogenes: 38 Stämme; L. innocua: 39 Stämme sowie neun Stämme von L. seeligeri) und
- c) 31 Stämme aus Fleisch und Fleischprodukten des Inlandes (L. monocytogenes: 13 Stämme; L. innocua: zehn Stämme; L. seeligeri: acht Stämme).

Es wurden zur Beimpfung der Chorioallantoismembran noch vier aus Käsen isolierte Stämme herangezogen, die sich biochemisch und nach der Hämolyse (negativ) wie L. innocua verhalten, deren O- und H-Antigene aber für L. monocytogenes (Sv 1/2 a) sprechen (Befund des Institutes für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg).

Tabelle 8: Referenzstämme

Spezies	Serovare	Stamm-Nr.
L. monocytogenes (n = 13)	1/2 a	SLCC 5764
	1/2 b	SLCC 2755
	1/2 c	NCTC 5348
	3 a	NCTC 5105
	3 b	SLCC 2540
	3 c	SLCC 2479
	4 a	NCTC 5214
	4 b	SLCC 4013
	4 ab	NCTC 10528
	4 c	ATCC 19116
	4 d	NCTC 1088
	4 e	ATCC 19118
	7	SLCC 2482
L. ivanovii (n = 3)	5	SLCC 2379
	5	SLCC 4769
	5	ATCC 19119
L. innocua (n = 4)	6 a	SLCC 3379
	6 a	NCTC 11288
	6 b	SLCC 3423
	6 b	NCTC 11289
L. seeligeri (n = 1)	1/2 b	SLCC 3954
L. welshimeri (n = 1)	6 a	SLCC 5334
(n = Anzahl der Stämme)		

3.1.3. Methodik

Die Stämme wurden auf Schrägagar im Kühlschrank bei 5 °C gelagert. Vom Schrägagar wurden mittels Öse einige Kolonien in 6 ml des Kulturmediums überimpft und 18 h bei 35 °C bebrütet. Um die Infektionsdosis nachträglich feststellen zu können, wurde die Bestimmung der Listerienzahl (LZ) pro ml Bouillon nach dem Tropfplattenverfahren in Anlehnung an DIN 10 161 Teil 2 vorgenommen. Dazu wurden von jedem Stamm Dezimalverdünnungen bis zur Verdünnungsstufe 10^{-7} angelegt.

Die Beimpfung des Nährbodens (modif. McBride-Agar) erfolgte so, daß pro Verdünnungsstufe 6 X 0.05 ml auf zwei Platten (je 3 X 0.05 ml auf eine Platte) auf die Nährbodenoberfläche aufgetropft wurden. Die Bebrütung der Platten erfolgte bei 35 °C für 48 h. Die Berechnung der LZ erfolgte nach der Formel:

Koloniezahl/ml Kultur = Mittelwert der Kolonien aus 6 Tropfen der auswertbaren Verdünnungsstufe X 20. Dabei wurden nur Tropfen mit 5-50 Kolonien pro Tropfen ausgewertet.

Bei allen Stämmen wurde zur Beimpfung der Eier die Verdünnungsstufe 10^{-4} herangezogen, wobei die Infektionsdosis erst nach Abschluß der Keimzahlbestimmung ermittelt werden konnte.

Die Beimpfung der Bruteier (fünf Eier/Listerienstamm) erfolgte nach folgenden Methoden:

1. Seitliche Beimpfung des Dottersacks (DS) nach MAYR et al. (1974) am 7tägigen Hühnerembryo

Die Hühnereier wurden 7 Tage vertikal vorbebrütet (horizontale Vorbrut wäre auch geeignet, war aber in dem uns zu Verfügung stehenden Eierbrutschrank der Fa. Petersima nicht möglich). Mit der Schierlampe wurde die Schalenseite aufgesucht, an der die Chorioallantoismembran (CAM) am schwächsten entwickelt ist, gewöhnlich dem Embryo gegenüber. Nach vorheriger Desinfektion mit 70 %igem Isopropylalkohol, wurde etwa in Eimitte und auch über der Luftkammer zum Druckausgleich je ein kleines Loch in die Schale gebohrt. Am horizontal gelagerten Ei geht man nun von oben mit einer Kanüle (0.6 X 30 mm, N. 14, Fa. Terumo Europe N. V., 3030 Leuven, Belgien) senkrecht bis zur Eimitte ein und injiziert 0.1 ml (Einmalspritzen, 1 ml LUER) der Kulturverdünnung. Sitzt die Kanüle richtig, erscheint bei Aspiration gelber Dotter im

Kanülenansatz. Beide Impföffnungen wurden mit tropffreiem Klebstoff (UHU extra) verschlossen. Die Infektionsbrut erfolgte in derselben Lage wie die Vorbrut, nämlich vertikal.

2. Beimpfung der Chorioallantoismembran (CAM) am senkrecht stehenden Ei nach MAYR et al. (1974)

Dazu wurden 10tägige, ebenfalls vertikal bebrütete Hühnereier verwendet. Nach vorheriger Desinfektion mit 70%igem Isopropylalkohol wird mit einer sterilen Nadel am senkrecht stehenden Ei die Luftkammer durch ein kleines Loch eröffnet. Mit einer Kanüle geht man zunächst nur etwa 6 mm tief ein, deponiert 0.1 ml der Kulturverdünnung auf der inneren Schalenhaut, sticht dann aber 2.5 cm tief durch die innere Schalenhaut und die CAM und zieht die Kanüle sofort heraus. Das Inokulum verteilt sich von selbst auf der CAM (Abb. 1). Die Impföffnung wurde mit tropffreiem Klebstoff verschlossen, die Eier senkrecht weiter bebrütet.

Bei beiden Methoden wurden als Kontrolleier verwendet:

- a) unbeimpfte Eier,
- b) mit 0.1 ml einer listerienfreien, sterilen Bouillon (Verdünnungsstufe 10^{-4} mit Ringerlösung) beimpfte Eier.

Die Eier wurden 6 Tage lang täglich geschieft. Danach noch lebende Embryonen wurden für 2 h zum Absterben in den Kühlschrank (5 °C) verbracht.

Um eventuell eingeschleppte Fremdkeime auszuschließen, wurden die abgestorbenen Embryonen in toto, ohne Eischale und innere Schalenhaut, im Colworth Stomacher 80 zerkleinert und eine Öse davon auf Schafblutagar ausgestrichen und 48 h bei 35 °C bebrütet.

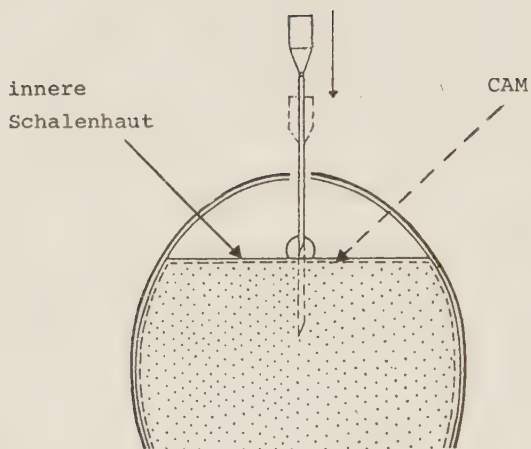


Abbildung 1: Beimpfung der CAM am senkrecht stehenden Ei
(nach MAYR et al., 1974)

3.4. Ergebnisse

Die Bestimmung der absoluten Listerienmenge, die in die Eier inokuliert wurde, ergab Keimmengen im Bereich von 1×10^2 bis 3×10^4 pro Ei. Da auf den beimpften Blutplatten nie andere Keime als Listerien nachgewiesen werden konnten, ist der Einfluß sonstiger Keime auszuschließen.

Die Ergebnisse der Dottersackbeimpfung sind in den Tab. 9 und 10 wiedergegeben.

Embryonen, beimpft mit *L. monocytogenes* und *L. ivanovii* starben innerhalb von 72 Stunden zu 100 % ab, gefolgt von *L. welshimeri* mit 80 %. Die Stämme von *L. seeligeri* benötigten bis zu 96 Stunden, um ebenfalls 100 % der Embryonen abzutöten.

L. innocua zeigte Absterbequoten bis zu 25 %. Dies betraf allerdings nur die aus Käse isolierten Stämme, während die vier Referenzstämme keinen letalen Effekt zeigten.

Bei der CAM-Beimpfung (Tab. 11, 12 und 13) ergaben sich nur noch bei *L. monocytogenes* und *L. ivanovii* Absterbequoten von 100 % innerhalb von 72 h.

Bei den übrigen Spezies starben, ähnlich wie bei den Kontrollen, nie mehr als zwei Embryonen pro Stamm ab.

Die Abtötung durch apathogene Stämme zeigte außerdem eine Häufung am 1. Tag nach der Inokulation.

Die vier gesondert beschriebenen Stämme (biochemisch und nach der Hämolyse wie *L. innocua*, aber Sv 1/2 a) führten in keinem Fall zum Absterben der Embryonen.

Tabelle 9: Absterbequoten von Hühnerembryonen nach Infektion des DS
mit aus Käse isolierten *Listerien*stämmen am 7. Tag

Spezies (Zahl der Stämme)	Anzahl abgestorbener Embryonen						insgesamt be- nutzte Eier	Absterbe- quote in %
	Tage nach der Infektion							
	1	2	3	4	5	6		
L. mono- cytogenes (20)	34	60	6	-	-	-	100	100
L. innocua (20)	13	4	5	3	-	-	25	25
L. seeligeri (9)	4	23	17	1	-	-	45	100

Tabelle 10: Absterbequoten von Hühnerembryonen nach Infektion des DS mit *Listeria*-Referenzstämmen am 7. Tag

Spezies	Anzahl abgestorbener Embryonen abgestorbene insgesamt be-						Absterbe-
(Zahl der	Tage nach der Infektion Embryonen nutzte Eier						quote in %
Stämme)	1	2	3	4	5	6	
L. mono-							
cytogenes							
(13)	9	51	5	-	-	65	100
L. ivanovii							
(3)	6	5	4	-	-	15	100
L. innocua							
(4)	-	-	-	-	-	0	0
L. seeligeri							
(1)	-	1	3	1	-	5	100
L. welshimeri							
(1)	1	-	3	-	-	4	90
Kontrolle							
(unbeimpft)	-	-	2	-	-	2	10
Kontrolle							
(sterile	1	2	-	-	-	3	15
Bouillon)							

Tabelle 11: Absterbequoten von Hühnerembryonen nach Infektion der CAM
mit *Listeria*-Referenzstämmen am 10. Tag

Spezies (Zahl der (Stämme)	Anzahl abgestorbener Embryonen abgestorbene insgesamt be- Tage nach der Infektion Embryonen nutzte Eier quote in %							
	1	2	3	4	5	6		
L. mono- cytogenes (13)	12	45	8	-	-	65	100	
L. ivanovii (3)	3	12	-	-	-	15	100	
L. innocua (4)	1	-	-	-	-	1	5	
L. seeligeri (1)	-	-	-	-	1	1	10	
L. welshimeri (1)	-	-	-	-	-	0	0	
Kontrolle (unbeimpft)	-	-	1	-	-	1	20	5
Kontrolle (sterile Bouillon)	2	-	1	-	-	3	20	15

Tabelle 12: Absterbequoten von Hühnerembryonen nach Infektion der CAM mit aus Käse isolierten *Listerien*stämmen am 10. Tag

Spezies (Zahl der Stämme)	Anzahl abgestorbener Embryonen						abgestorbene insgesamt be- nutzte Eier	Absterbe- quote in %
	1	2	3	4	5	6		
<i>L. monocytogenes</i>								
(38)	24	153	13	-	-	-	190	100
<i>L. innocua</i>								
(39)	11	6	2	-	-	-	19 ^{*)}	9.7
<i>L. seeligeri</i>								
(9)	4	-	-	1	-	-	5 ^{*)}	11.7

*) maximal 2 Embryonen pro Stamm abgestorben

Tabelle 13: Absterbequoten von Hühnerembryonen nach Infektion der CAM
mit aus Fleisch und Fleischprodukten isolierten
Listerienstämmen am 10. Tag

Spezies (Zahl der Stämme)	Anzahl abgestorbener Embryonen abgestorbene insgesamt be- Tage nach der Infektion Embryonen nutzte Eier Absterbe- quote in %						
	1	2	3	4	5	6	
L. mono- cytogenes (13)	10	55	-	-	-	65	100
L. innocua (10)	1	-	-	-	-	1	100
L. seeligeri (8)	1	-	3	-	-	4*)	40
							10

*) maximal 2 Embryonen pro Stamm abgestorben

3.2. Untersuchungen zur Hitzeresistenz von Listerien

3.2.1. Modellversuch einer Milchpasteurisierung mit in vitro phagozytierten Listerien

3.2.1.1. Medien und Reagenzien

-Physiol. Kochsalzlösung:

NaCl reinst (Merck 6400)	8.5 g
Aqua dest.	1000 ml

-Kulturmedium: s. 3.1.1.

-Phosphatpuffer (PBS):

NaCl reinst (Merck 6400)	6.79 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ (Merck 6576)	1.47 g
KH_2PO_4 (Merck 4873)	0.43 g
mit Aqua dest. auf auffüllen, auf pH einstellen	1000 ml 7.2

-Methylenblaulösung:

Methylenblau (DAB 7)	0.5 g
Ethanol (96 %)	30 ml
Kaliumhydroxidlösung (99 ml Aqua dest. 1 ml 1 %ige KOH (Merck 5033))	100 ml

-BREED-Färbelösung:

Methylenblau (DAB 7)	0.6 g
Ethanol (96 %)	54 ml
Tetrachloräthan	40 ml
Eisessig (100 %)	6 ml

-Anreicherungsbouillon (Enrichment Broth;EB)
(LOVETT et al., 1987):

Basisnährboden:

Tryptone Soya Broth (Oxoid CM 129)	30 g
Yeast Extract (Oxoid L 21)	6 g
Aqua dest.	1000 ml

supplementiert mit:

Acriflavin (Sigma A 8251)	15 mg/l
Nalidixinsäure (Sigma N 4382)	40 mg/l
Cycloheximid (Sigma C 6255)	50 mg/l

-Modifizierter McBride-Agar: s.3.1.1.

-TSA-YE-Agar: Tryptone Soya Agar (Oxoid CM 131)	40 g
Yeast Extract (Oxoid L 21)	6 g
Aqua dest.	1000 ml

-KOH-Lösung (Merck 5033), 0.5 %ig

-KOH-Lösung (Merck 5033), 3 %ig

-H₂O₂-Lösung (Merck 8600), 3 %ig

3.2.1.2. Material

- Versuchstiere: 3 laktierende Milchkühe des Lehr- und
Versuchsgutes Oberschleißheim

- L. monocytogenes-Stämme für die Beimpfung der Milch:

Kuh 1: NCTC 5105, Sv 3 a

Kuh 2: NCTC 5105, Sv 3 a

Kuh 3: Sv 1/2 a

Sv 4 b (beide Stämme aus Käse isoliert)

-L.monocytogenes-Stamm SLCC 4013, Sv 4 b

3.2.1.3. Methodik

a) Gewinnung leukozytenreicher Milch durch Provokation einer sterilen Euterentzündung

Den drei Versuchskühen wurden zur experimentellen Irritation der Milchdrüse jeweils 150 ml sterile physiologische Kochsalzlösung (in Anlehnung an HEYERMANN und SENFT, 1985), unter Zusatz von 0.01 ml einer sterilfiltrierten Listerienkultur (Stamm L. monocytogenes SLCC 4013, in Kulturmedium 16 h bei 35 °C bebrütet, anschließend sterilfiltriert mit Minisart NML, 0.2 µm (Fa. Sartorius)) zur eventuellen Verstärkung der Stimulation, nach dem Melken am Nachmittag (16⁰⁰) in ein Euterviertel durch den Strichkanal eingegeben. Bei der nächsten Melkzeit morgens (6⁰⁰) wurde die Milch dieses Viertels gesondert mit der Hand ermolken.

b) "Infektion" der Milch mit L. monocytogenes

Zuerst wurde der Gehalt an somatischen Zellen der Milch nach Angaben der DEUTSCHEN VETERINÄRMEDIZINISCHEN GESELLSCHAFT (1980) bestimmt. Die mikroskopische Auswertung erfolgte mit Ölimmersion (Mikroskop: Fa. E. Leitz, Wetzlar, ORTHOLUX II). Da sich nach SCHALM et al. (1964) die Phagozytose von Keimen besser demonstrieren läßt, wenn die Bakterienzahl die Zellzahl übersteigt, wurden zur "Infektion" der Milch die Listerien in einer um eine Zehnerpotenz höheren Menge als vorhandene Zellen zugegeben.

Der jeweils zugesetzte Stamm bzw. die Stammischung wurde 16 h bei 35 °C in Kulturmedium angezüchtet und 30 min bei 2500 rpm zentrifugiert (Heraeus Sepatech Minifuge RT). Der Überstand wurde abpipettiert und der Bodensatz 3 X mit PBS gewaschen, zu einem Fünftel des Ausgangsvolumens mit PBS aufgefüllt und zur zellreichen Milch gegeben. Diese wurde anschließend 30 min bei 35 °C inkubiert.

Das "Kieler Sedimentaustrichverfahren", nach den Angaben der METHODENKOMMISSION (1960) durchgeführt, diente zur Beurteilung der Phagozytose der zugegebenen Listerien durch neutrophile Granulozyten (PMN). Auszählungen von je 20 Gesichtsfeldern (pro Versuchsansatz) ergaben Listerienzahlen von 0 bis 20, die in einem Granulozyten enthalten waren (durchschnittlich etwa 4

Listerien pro Granulozyt).

Ebenso wurden in Zusammenarbeit mit dem Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin der Tierärztlichen Fakultät der LMU München elektronenoptische Aufnahmen der phagozytierten Listerien vorgenommen (Abb. 2).

Anschließend wurde die Milch zur Verdünnung des Zellgehaltes (Gefahr des Verstopfens der Anlage) auf 5 l mit Rohmilch eines anderen, nicht behandelten Viertels der jeweils selben Kuh aufgefüllt. Die Zell- und Keimgehalte dieser "Mischungen", mit denen dann die Erhitzung durchgeführt wurde, sind in der folgenden Tab. 14 wiedergegeben.

Tabelle 14: Zell- und Listeriengehalte der Milchmodischungen

	Zellzahl/ml	Listerienzahl/ml	
		insgesamt	phagozytiert
Kuh 1	8.5×10^6	7.8×10^7	2.2×10^7
Kuh 2	1.2×10^6	6×10^6	3.4×10^6
Kuh 3	3×10^6	6×10^6	5.8×10^6

c) Erhitzung der Milch

Die listerienhaltige Milch wurde (nach Kühlung für 24 h bei 4 °C) an einer Modellröhrenerhitzungsanlage in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. Kessler (Lehrstuhl für Lebensmittelverfahrenstechnik und Molkereitechnologie der Technischen Universität München) erhitzt. Dieser Röhrenerhitzer besteht aus fünf Röhren aus V₂A-Stahl (Außendurchmesser 1.3 mm, Wandstärke 0.14 mm). Die Aufwärmzeit der Milch auf die Erhitzungstemperatur betrug 0.75 bis 1 s. Die Erhitzungstemperatur konnte auf ± 0.3 °C genau eingestellt werden.

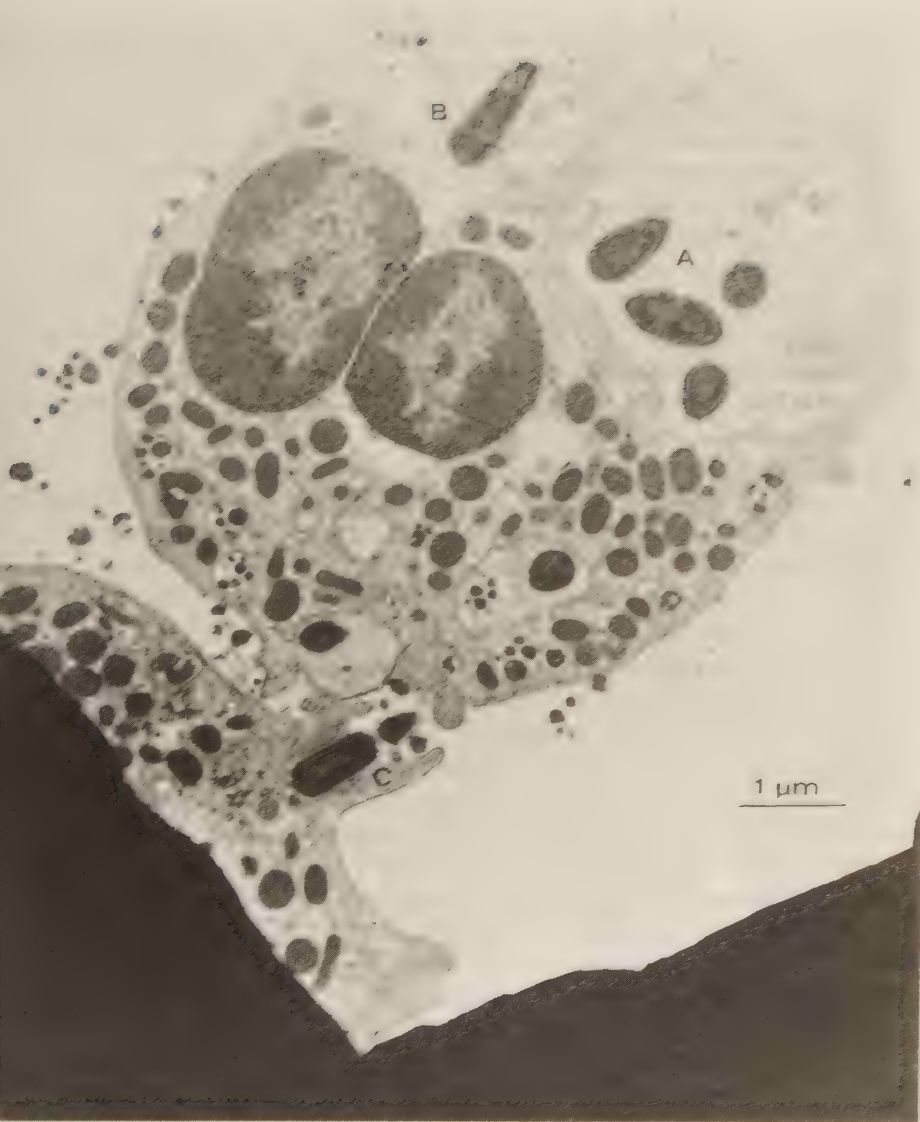


Abbildung 2: Elektronenmikroskopische Aufnahme :
2 neutrophile Granulozyten, Listerien
A: Listerien in Vakuole
B: Listerie frei im Zytosol liegend
C: Listerie, die phagozytiert wird

Es wurden die Temperaturen 66, 69, 72 und 75 °C gefahren, die jeweils gewählte "Pasteurisierungszeit" im Warmhaltebehälter (Ölbäd) betrug 15 sec. Bei jeder Temperatur wurden zwei bzw. drei (Versuch 3) Proben à 40 ml in sterile Glasfläschchen entnommen; diese erhitzte Milch wurde bis zur Voranreicherung gekühlt.

d) Nachweis der Listerien in der erhitzten Milch

(in Anlehnung an die Methode der FDA (nach LOVETT et al., 1987))

Die Isolierung der Listerien aus den Milchproben erfolgte in Anlehnung an die Methode der FDA und ist in Abb. 3 schematisch dargestellt.

25 ml der Milch wurden mit 225 ml Anreicherungsbouillon (ohne Supplemente) vermischt und zur Resuszitierung hitzegeschädigter Keime 6 h bei Raumtemperatur stehengelassen (unselektive Voranreicherung).

Nach Supplementzugabe erfolgte die Inkubation (30 °C, 24 h) in einem Brutschrank (Fa. Memmert, Modell 40). Anschließend wurden 0.1 ml des obigen Ansatzes mit 10 ml Anreicherungsbouillon versetzt und ebenso bebrütet (Unteranreicherung; UA).

Nach der Inkubation wurden beide Ansätze direkt, der unverdünnte Ausgangsansatz zusätzlich unmittelbar nach Versetzen der Bouillon mit 0.5 %iger KOH-Lösung im Verhältnis 1:10, auf McBride-Agar ausgestrichen. Ebenso wurde nach 7 Tagen Bebrütung nochmals verfahren. Nach 48stündiger Bebrütung der Platten bei 35 °C erfolgte die Auswertung mit dem Beleuchtungsverfahren nach HENRY (HENRY, 1933). Als Beleuchtungsquelle diente eine Lampe (6 Volt, 15 Watt), deren Lichtstrahl in einem 45°-Winkel auf einen Spiegel traf und von dort auf die Bodenfläche der Agarplatte reflektiert wurde.

Listerienverdächtige Kolonien (matt, bläulichgrau) wurden zur Reinigung auf TSA-YE-Agar überimpft und 24 h bei 35 °C bebrütet. Die Beurteilung der Kolonien erfolgte ebenfalls mittels der HENRY'schen Beleuchtungstechnik und verdächtige Kolonien wurden den Schnelltests unterzogen.

Schnelltests:

1) Nativpräparat:

Eine verdächtige Kolonie wurde mit einer Platinöse mit einem Tropfen Ringerlösung verrieben. Bei der Betrachtung im Phasenkontrastmikroskop (E. Leitz, Wetzlar, 440316) mittels Ölimmersion wurden die Morphologie und Beweglichkeit der Keime beurteilt. Listerien erscheinen als kurze, plumpe Stäbchen, die sich taumelnd oder rotierend fortbewegen.

2) Prüfung der Katalasebildung:

Dazu wurden verdächtige Kolonien mittels einer Platinöse mit einem Tropfen 3 %iger H_2O_2 -Lösung verrieben. Sauerstofffreisetzung zeigte sich durch "Schaumbildung".

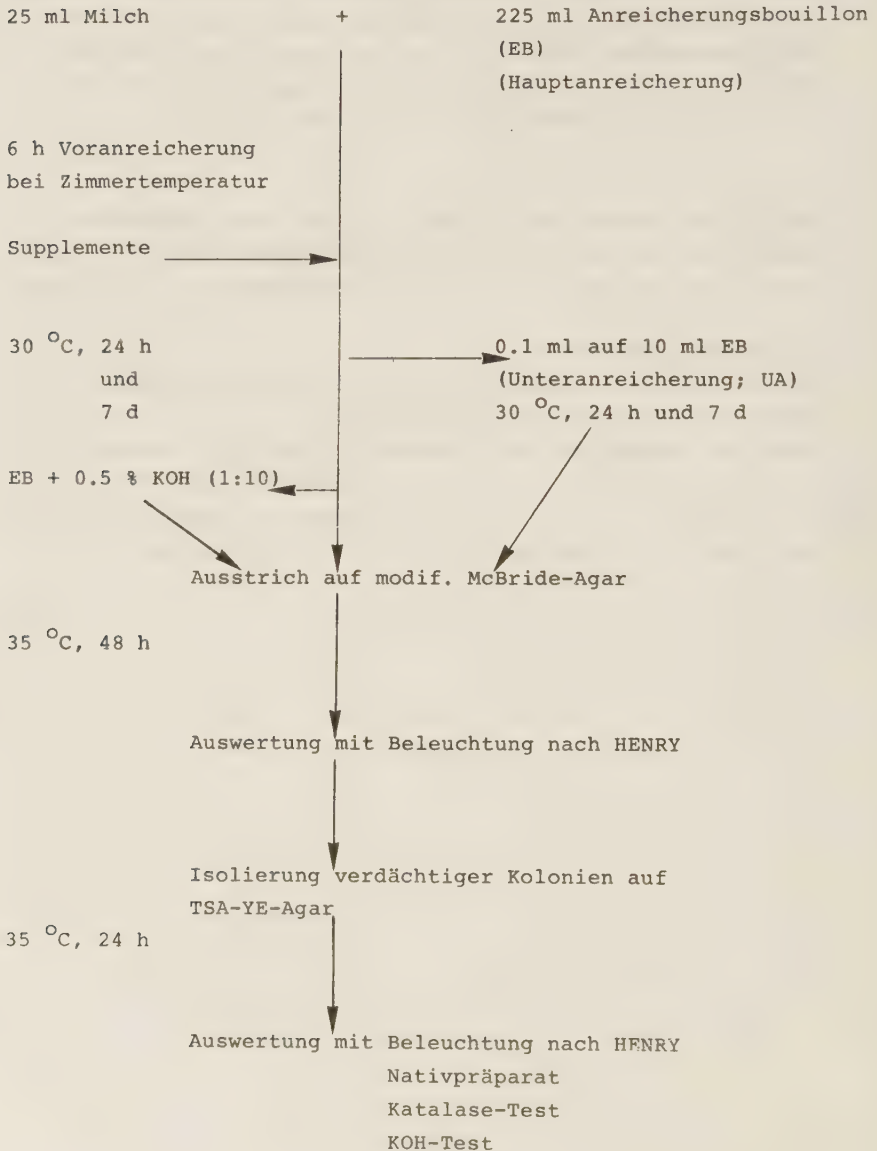
3) Prüfung des Gramverhaltens:

Eine verdächtige Kolonie wurde mit einer Platinöse mit einem Tropfen 3 %iger KOH-Lösung verrieben.

Negatives Gram-Verhalten: Viskositätserhöhung, sichtbar am Anhaften eines Schleimfadens beim Hochheben der Öse vom Objektträger.

Positives Gram-Verhalten: Ausbleiben dieser Erscheinung.

Abbildung 3: Schema des Listeriennachweises in der Milch
(in Anlehnung an die Methode der FDA
nach LOVETT et al., 1987)



Bei Versuch 3 (Kuh Nr. 3, Tab. 16) wurden beim Nachweis der Listerien einige Änderungen vorgenommen:

- Die Milch wurde zusätzlich nach der Erhitzung direkt auf McBride-Agar ausgestrichen,
- bei der bei 69 °C erhitzten Milch wurden zwei von drei Proben nicht vorangereichert (a, a'),
- bei der bei 72 °C erhitzten Milch wurden zwei von drei Proben über 20 h vorangereichert (b, b').

3.2.1.4. Ergebnisse (Tabb. 15 und 16)

Die Beurteilung der Ausstriche der erhitzten Milch ergab, daß Listerien bei allen drei Versuchstieren nur in den 0-Kontrollen (unerhitzte Milchmischung), bei 66 °C und bei Versuch 2 (Kuh Nr. 2, Tab. 15) bei 69 °C in der Unteranreicherung nachgewiesen werden konnten, nie aber in der bei 72 bzw. 75 °C erhitzten Milch (Tabb. 15 und 16).

Tabelle 15: Ergebnisse der Erhitzungsversuche in der Modellpasteurierungsanlage

Erhitzungs- temperatur °C/ Probe	Versuch 1 (Kuh 1)		Versuch 2 (Kuh 2)			
	Ausstriche aus der selektiven Anreicherung nach 24 h		Anreicherung nach 24 h			
	Direkt KOH ⁽¹⁾ UA	Direkt KOH UA	Direkt KOH UA	Direkt KOH UA	Direkt KOH UA	Direkt KOH UA
66 a	+	-	+	-	+	+
66 b	+	+	+	+	+	+
69 a	-	-	-	-	-	-
69 b	-	-	-	-	-	-
72 a	-	-	-	-	-	-
72 b	-	-	-	-	-	-
75 a	-	-	-	-	-	-
75 b	-	-	-	-	-	-
0 ⁽³⁾ a	-	-	-	-	-	-
0 ⁽³⁾ b	+	+	+	+	+	+

(1) Vor Ausstreichen mit 0.5 % KOH behandelt

(2) Unteranreicherung (s. Abb. 3)

(3) O a: Rohmilch

b: listerienhaltige, unerhitzte Milchmischung

Tabelle 16: Ergebnisse der Erhitzungsversuche in der Modell-
pasteurierungsanlage

Versuch 3 (Kuh 3)				
Erhitzungs- temperatur OC/ Probe	Ausstriche aus der selektiven Anreicherungs- nach 24 h		Ausstriche gleich nach 7 d	
	Direkt KOH (1	UA (2	Direkt KOH	UA
ohne Anreicherungs- flüssigkeit				
66 a	+	-	+	+
69 a	-	-	-	-
a'	-	-	-	-
b	-	-	-	-
72 a	-	-	-	-
b	-	-	-	-
b'	-	-	-	-
75 a	-	-	-	-
0 ⁽³ a	-	-	-	-
b	+	+	+	+

(1, (2, (3 Zeichenerklärung: s. Tab. 15

3.2.2. D-Wert-Bestimmungen in Glasröhrchen

3.2.2.1. Medien und Reagenzien

-Kulturmedium: s. 3.1.1.

-Ringerlösung: s. 3.1.1.

-TSA-YE-Agar: s. 3.2.1.1.

3.2.2.2. Material

- L. monocytogenes-Stämme: a) Sv 1/2 a
b) Sv 1/2 a
c) Sv 1/2 b
d) Sv 3 a NCTC 5105 *)
e) Sv 4 b

*) Referenzstamm, alle anderen wurden aus Käse isoliert

-Glasröhrchen: Länge 13 cm

Außen Ø 4 mm

Innen Ø 2.5 mm

Wandstärke 0.75 mm

(Maßanfertigung der Fa. Göddeke, Ingolstadt)

-Einmalspritzen: 1 ml LUER 100 T, Fa. Henke-Sass Wolf, Tübingen

-Einmalkanülen: 0.6 X 30 mm, N. 14, Fa. Terumo Europe N. V.,
Leuven, Belgien

-O-Ringe (Gummimaterial, aus dem die Verschlüsse der
Glasröhrchen (s. 3.2.2.3.) zurechtgeschnitten wurden)

3.2.2.3. Methodik

Der jeweils zu untersuchende Listerienstamm (a, b, c, d, und e) wurde für 16 h bei 35 °C in 100 ml Kulturmedium angezüchtet. Die sterilen Glasröhrchen wurden mittels Kanülen und Spritzen mit je 0.5 ml der keimhaltigen Bouillon gefüllt, mit autoklavierten Gummistopfen (passend zurechtgeschnittene O-Ringe) wasserdicht verschlossen und anschließend 5 min bei Raumtemperatur zur Temperaturangleichung stehengelassen. Vor der Erhitzung wurden die Röhrchen gründlich (10 s) auf einem Reagenzglasschüttler (Fa. Janke & Kunkel IKA VF2) durchmischt. Die Röhrchen wurden mit einer Klammer, die nur den Gummi der Stopfen faßte, also nicht das Glas berührte, in einem Wasserbad mit Umwälzpumpe (Fa. Haake, Typ FK, Berlin, Karlsruhe) gehalten, so daß die Röhrchen völlig im Wasser versenkt waren, dann erhitzt und danach zum Abkühlen für 5 min in Eiswasser gestellt. Pro Temperatur/Zeit-Kombination (Tab. 17) wurden von derselben Keimsuspension Doppelversuche mit je zwei Röhrchen durchgeführt.

Tabelle 17: Temperatur/Zeit-Kombinationen
der Erhitzung von Listerienstämmen
in Röhrchen

Temperatur (°C)	Zeit (s)
63	20, 40, 60, 80, 100, 120
65	10, 20, 30, 40, 50, 60
67	5, 10, 15, 20, 25, 30, 35
69	5, 10, 15, 20, 25
71	5, 10, 15, 20

Die erhitzte Keimsuspension wurde dann in 9.5 ml Ringerlösung überführt und die Anzahl der überlebenden Listerien nach dem Tropfplattenverfahren (3.1.3.) bestimmt. Pro Verdünnungsstufe wurden wieder 6 Tropfen mit je 0.05 ml auf die Oberfläche zweier TSA-YE-Platten (3 Tropfen/Platte) aufgetropft. Die damit ermittelte Keimzahl mußte allerdings noch mit 2 multipliziert werden, da ja die Ausgangslösung für eine Verdünnungsreihe nur aus 0.5 ml bestand.

3.2.2.4. Ergebnisse

Früher vertrat man die Auffassung, daß mit Erreichen einer bestimmten kritischen Temperatur plötzlich alle Bakterien einer Suspension absterben; heute ist jedoch bekannt, daß die Abtötung von Mikroorganismen einer Funktion von Temperatur und Zeit folgt. Die Thermoresistenz von Keimen wird seither so ermittelt, daß Keime bei verschiedenen Zeiten und Temperaturen erhitzt werden und die jeweils überlebende Keimmenge bestimmt wird. Trägt man den $\log_{10}$ der Keimzahl der überlebenden Bakterien gegen die Zeit auf, so erhält man im Idealfall eine Gerade (CHRISTOPHERSEN, 1973). Aus ihr läßt sich dann der D-Wert, auch als "dezimale Reduktionszeit" bezeichnet, ermitteln. Der D-Wert gibt die Zeit an, die nötig ist, um eine Bakterienpopulation um eine Zehnerpotenz zu reduzieren, d. h. 90 % abzutöten (OLSON und NOTTINGHAM, 1980).

Für jeden Stamm wurden nun die D-Werte bei den verschiedenen Temperaturen errechnet: die Listerienzahlen der Temperatur-Zeit-Einheit, die sich aus 4 Werten zusammensetzten, wurden gemittelt, und $\bar{x}$ zur D-Wert-Bestimmung herangezogen. Die Keimzahl der Überlebenden ($\log_{10}$ CFU/ml) wurde gegen die Zeit (Abszisse) aufgetragen und der entsprechende D-Wert aus der errechneten Regressionsgeraden (A) ermittelt. Diese Regressionsgeraden der verschiedenen Stämme bei unterschiedlichen Erhitzungszeiten sind in den Abb. 4, 6, 8, 10 und 12 wiedergegeben.

Die errechneten D-Werte in s ($\log_{10}$) für 63, 65, 67 und 69 °C wurden nun in Anlehnung an BRADSHAW et al. (1985) gegen die verschiedenen Temperaturen (Abszisse) aufgetragen (Abb. 5, 7, 9,

11 und 13). Nach Errechnung der Regressionsgeraden (B) konnte der D-Wert für 71 °C extrapoliert werden, um ihn mit dem experimentell ermittelten zu vergleichen (s. Tab. 19).

In Tab. 18 sind die errechneten Gleichungen dieser Regressionsgeraden (A;B) und die Korrelationskoeffizienten wiedergegeben.

Tab. 19 zeigt die D-Werte (s) der einzelnen Stämme bei den verschiedenen Temperaturen auf. Aus ihr ist ersichtlich, daß die experimentell ermittelten D-Werte für 71 °C 1.6-2.7 s betrugen; Extrapolation ergab Werte von 1.1 s bis 2.4 s bei 71 °C.

Aus den Zeit/Temperaturdiagrammen (Abb. 5, 7, 9, 11 und 13) kann auch der sogenannte "Z-Wert" abgelesen werden.

Gibt der D-Wert Auskunft über die Hitzeresistenz von Bakterien bei gegebener Temperatur, so erlaubt der "Z-Wert" (in °C) eine Aussage über den Temperaturanstieg, der benötigt wird, um den D-Wert auf ein Zehntel zu reduzieren (STREICHAN, 1967).

Tabelle 19 : D-Werte (in s) von Listerienstämmen, die bei verschiedenen Temperaturen in Glasröhrchen erhitzt wurden

Stamm (Sv)	D-Werte (in s) bei verschiedenen Temperaturen (°C)					
	63	65	67	69	71 (°C)	
					experi- mentell	extra- poliert
a) (1/2 a)	22.7	11.9	5.5	3.2	1.8	1.5
b) (1/2 a)	17.2	6.2	3.3	2.7	1.6	1.1
c) (1/2 b)	16.6	8.0	5.6	2.7	2.5	1.6
d) (3 a)	17.5	11.5	5.2	3.3	2.0	1.8
e) (4 b)	14.3	8.7	5.5	3.9	2.7	2.4

Tabelle 18: Erhitzungsversuche mit verschiedenen Listerienstämmen zur D-Wert-Bestimmung in Glasröhrchen;
Gleichungen der Regressionsgeraden (A^* ; B^{**}) und Korrelationskoeffizienten

Stamm:	a	b	c	d	e
A: 63 °C	$\bar{y} = 9.45 - 0.044x$ $r^2 = 0.99$	$\bar{y} = 7.97 - 0.058x$ $r^2 = 0.99$	$\bar{y} = 8.81 - 0.060x$ $r^2 = 0.99$	$\bar{y} = 7.97 - 0.057x$ $r^2 = 1.0$	$\bar{y} = 8.46 - 0.070x$ $r^2 = 0.99$
65 °C	$\bar{y} = 9.46 - 0.084x$ $r^2 = 0.99$	$\bar{y} = 8.82 - 0.16x$ $r^2 = 0.99$	$\bar{y} = 9.36 - 0.13x$ $r^2 = 1.0$	$\bar{y} = 9.46 - 0.087x$ $r^2 = 0.99$	$\bar{y} = 10.075 - 0.19x$ $r^2 = 0.93$
67 °C	$\bar{y} = 10.26 - 0.31x$ $r^2 = 0.98$	$\bar{y} = 10.17 - 0.31x$ $r^2 = 1.00$	$\bar{y} = 9.27 - 0.18x$ $r^2 = 1.00$	$\bar{y} = 9.44 - 0.19x$ $r^2 = 0.99$	$\bar{y} = 9.32 - 0.18x$ $r^2 = 1.00$
69 °C	$\bar{y} = 9.32 - 0.18x$ $r^2 = 1.00$	$\bar{y} = 10.045 - 0.37x$ $r^2 = 0.98$	$\bar{y} = 10.070 - 0.37x$ $r^2 = 0.98$	$\bar{y} = 10.32 - 0.31x$ $r^2 = 0.98$	$\bar{y} = 9.89 - 0.26x$ $r^2 = 0.96$
71 °C	$\bar{y} = 10.96 - 0.55x$ $r^2 = 1.00$	$\bar{y} = 12.63 - 0.64x$ $r^2 = 1.00$	$\bar{y} = 10.50 - 0.41x$ $r^2 = 0.97$	$\bar{y} = 10.83 - 0.52x$ $r^2 = 1.00$	$\bar{y} = 9.13 - 0.36x$ $r^2 = 0.95$
B:	$\bar{y} = 10.46 - 0.15x$ $r^2 = 1.00$	$\bar{y} = 9.56 - 0.13x$ $r^2 = 0.91$	$\bar{y} = 9.14 - 0.13x$ $r^2 = 0.98$	$\bar{y} = 9.14 - 0.13x$ $r^2 = 0.99$	$\bar{y} = 7.059 - 0.094x$ $r^2 = 0.99$

*) A : Regressionsgeraden der Keimzahl/Erhitzungszeit-Wertepaare

**) B: Regressionsgeraden der D-Wert/Temperatur-Wertepaare

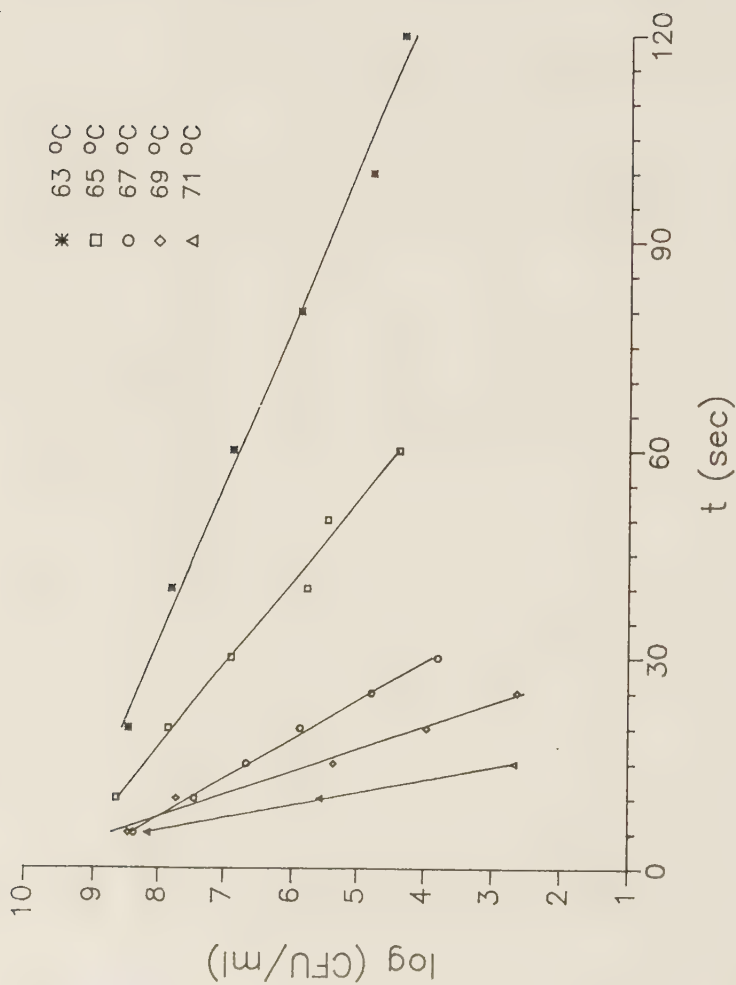


Abbildung 4: Stamm a (Sv 1/2 a)
Keimzahl/Zeit-Diagramm für Erhitzungsversuche zur
D-Wert-Bestimmung bei verschiedenen Temperaturen

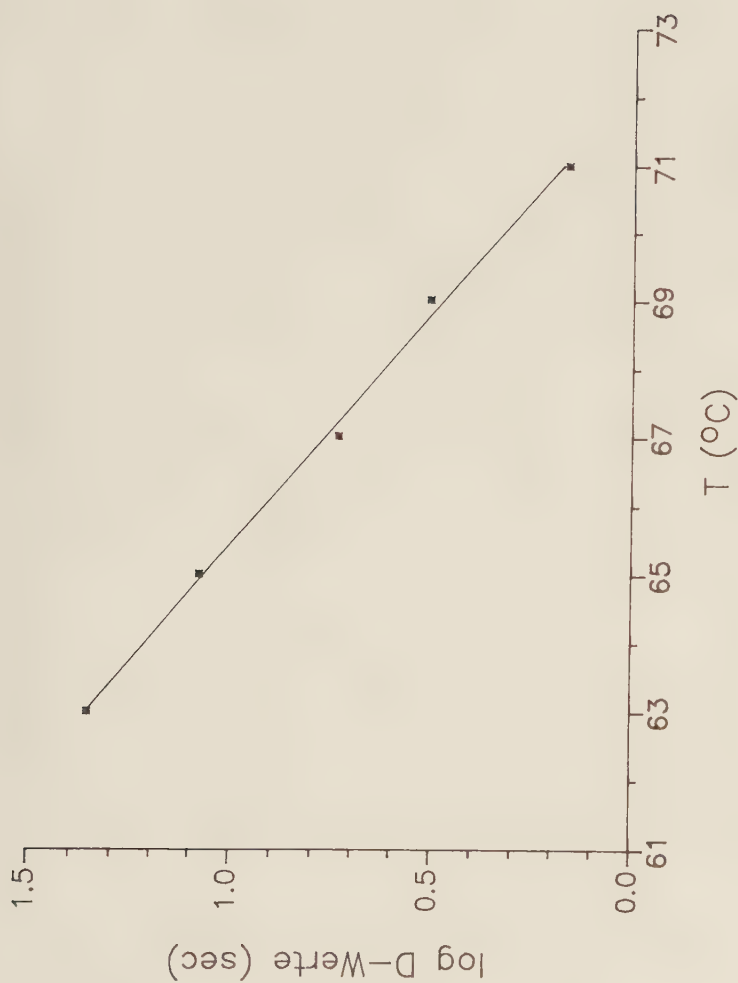


Abbildung 5: Stamm a (Sv 1/2 a)
Zeit/Temperatur-Diagramm für die Hitzeabtötung

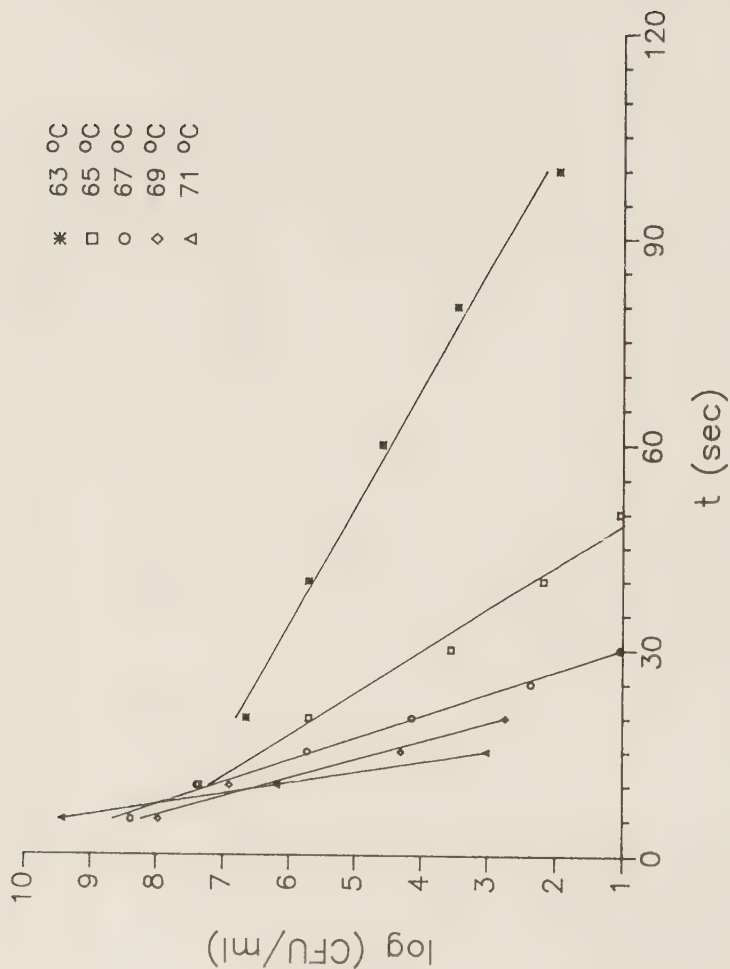


Abbildung 6: Stamm b (Sv 1/2 a)
Keimzahl/zeit-Diagramm für Erhitzungsversuche zur
D-Wert-Bestimmung bei verschiedenen Temperaturen

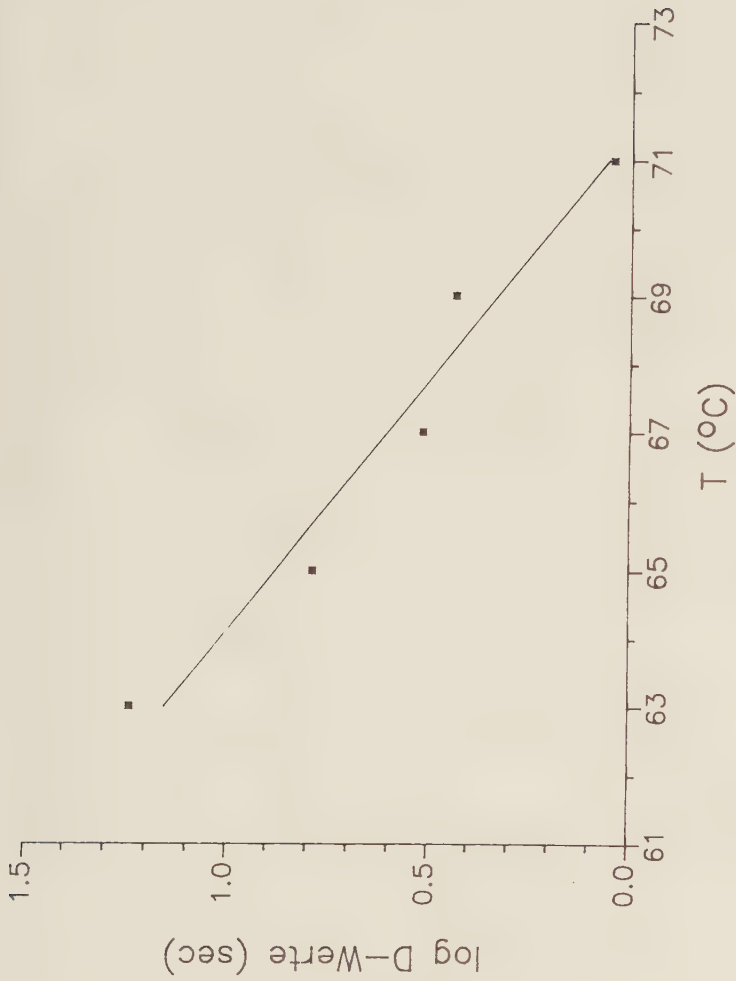


Abbildung 7: Stamm b (Sv 1/2 a)
Zeit/Temperatur-Diagramm für die Hitzeabtötung

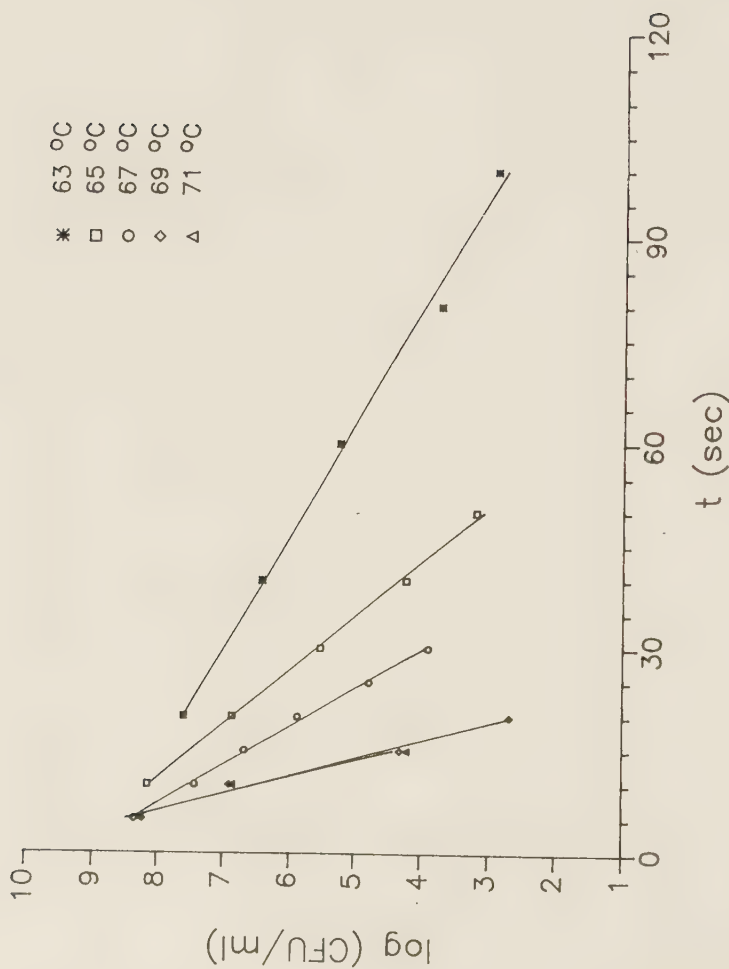


Abbildung 8: Stamm c (Sv 1/2 b)
Keimzahl/zeit-Diagramm für Erhitzungsversuche zur
D-Wert-Bestimmung bei verschiedenen Temperaturen

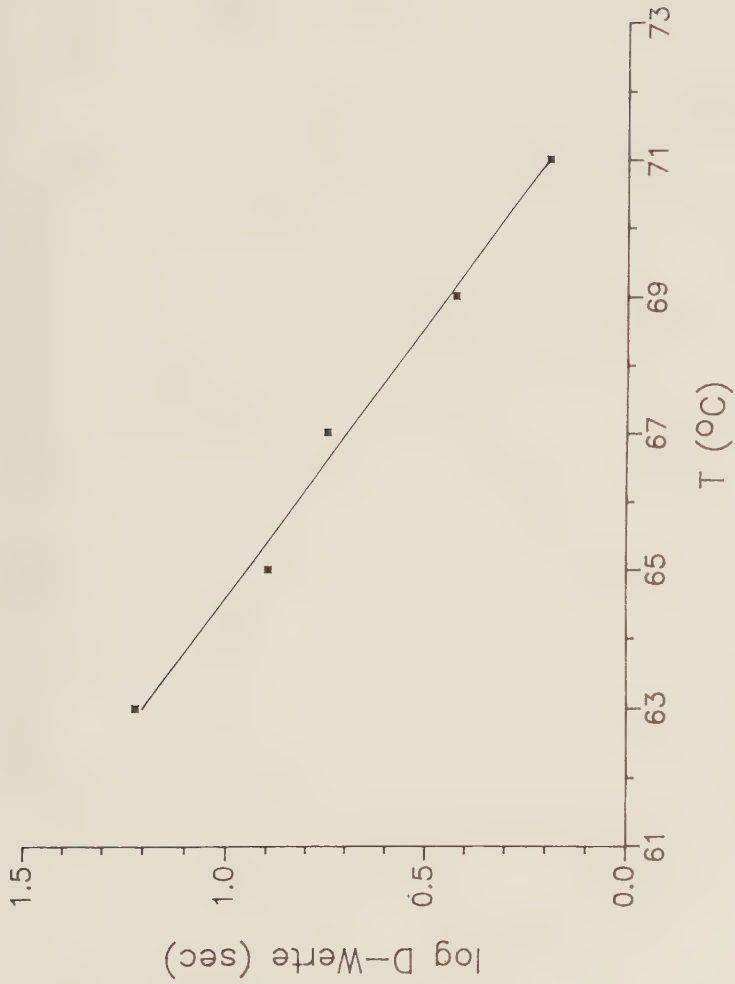


Abbildung 9: Stamm c (Sv 1/2 b)
Zeit/Temperatur-Diagramm für die Hitzeabtötung

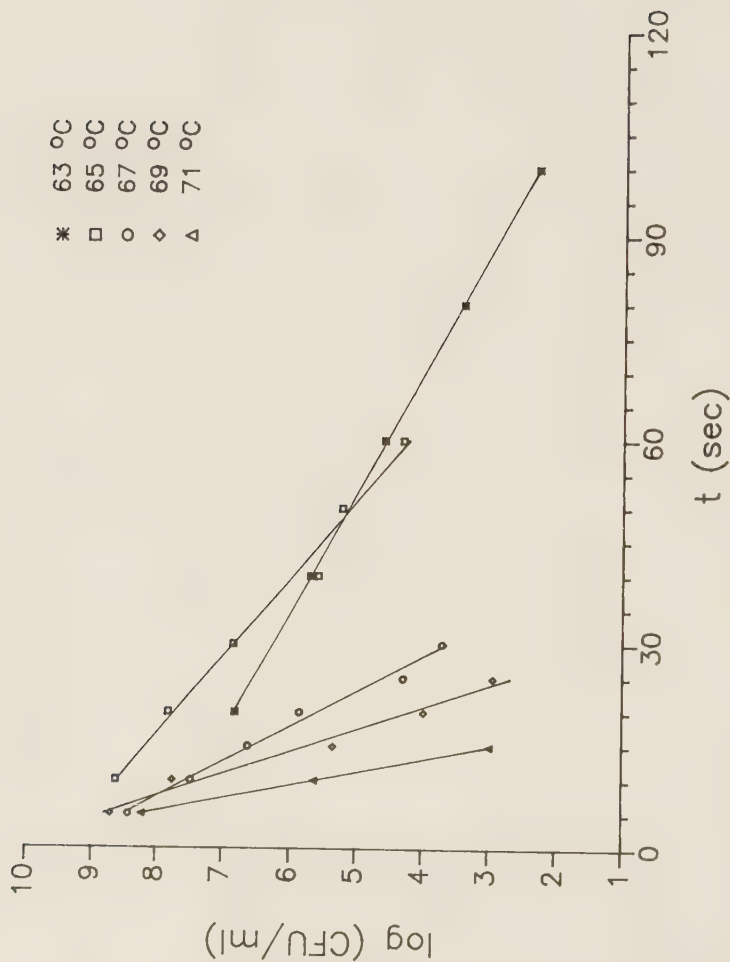


Abbildung 10: Stamm d (Sv 3 a; NCTC 5105)
Keimzahl/Zeit-Diagramm für Erhitzungsversuche zur
D-Wert-Bestimmung bei verschiedenen Temperaturen

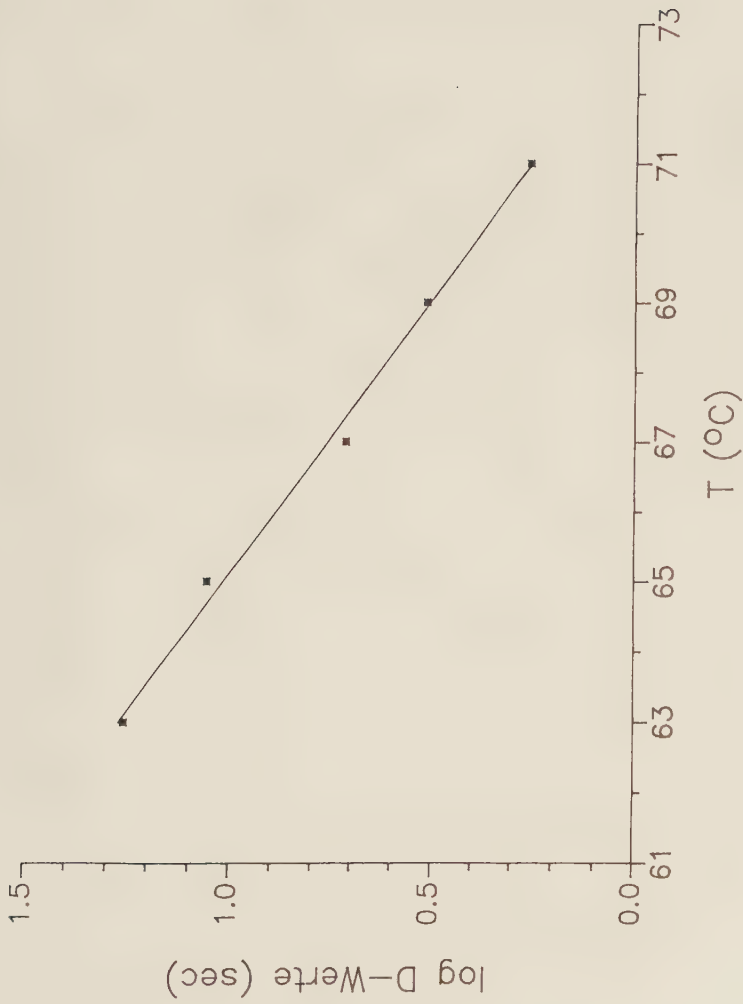


Abbildung 11: Stamm d (Sv 3 a; NCTC 5105)
Zeit/Temperatur-Diagramm für die Hitzeabtötung

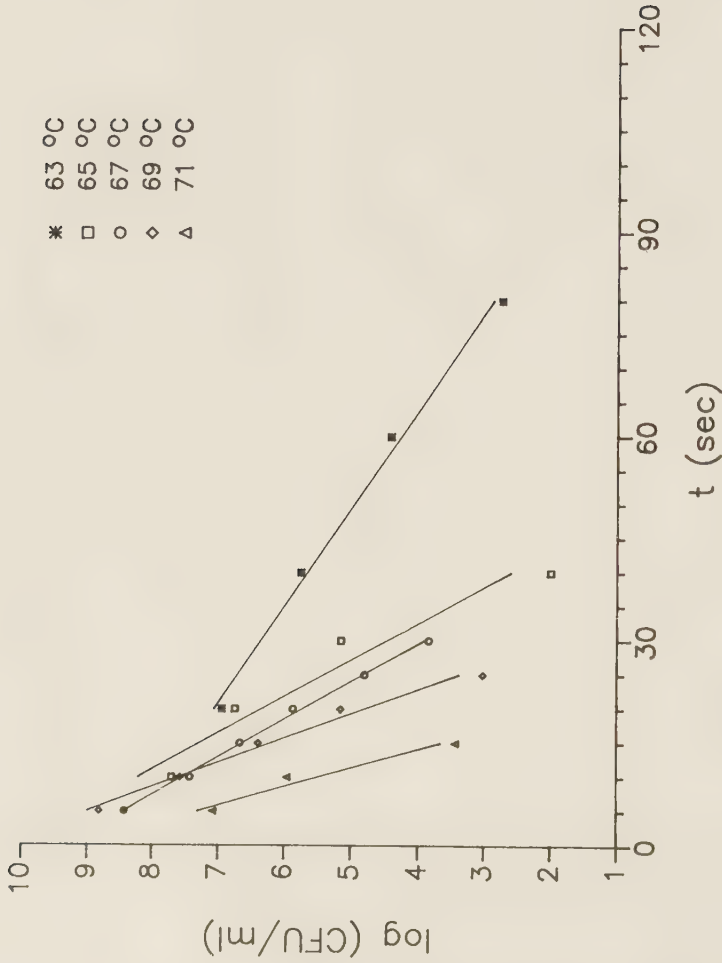


Abbildung 12: Stamm e (Sv 4 b)
Keimzahl/zeit-Diagramm für Erhitzungsversuche zur
D-Wert-Bestimmung bei verschiedenen Temperaturen

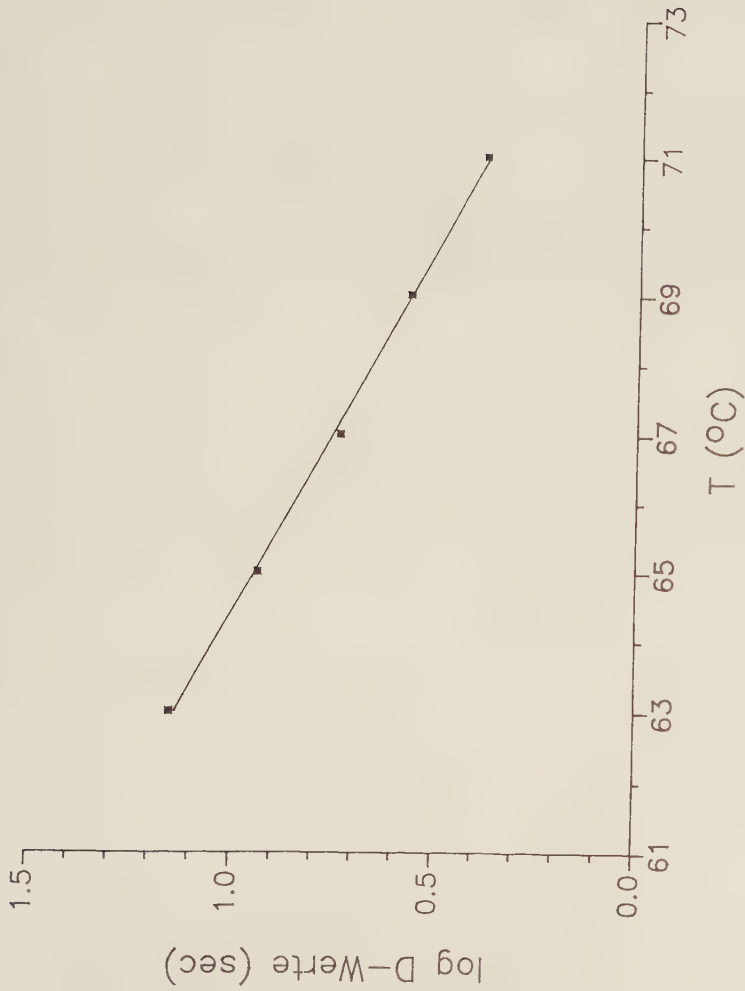


Abbildung 13: Stamme (Sv 4 b)
Zeit/Temperatur-Diagramm für die Hitzeabtötung

3.3. Empfindlichkeit verschiedener Listerienstämme gegen unterschiedliche Acriflavinkonzentrationen

3.3.1. Medien und Reagenzien

-Walzen-Natrium-Caseinat	40 g
(BMI, Bayerische Milchindustrie eG)	
Aqua dest.	1000 ml

-TSA-YE-Agar: s. 3.2.1.1.

-Ringerlösung: s. 3.1.1.

-Anreicherungsbouillon (EB): s. 3.2.1.1.

Supplemente: Im Versuch wurden neben Nalidixinsäure und Cycloheximid (3.2.1.1.) zwei verschiedene Acriflavinkonzentrationen eingesetzt:

15 mg/l EB

30 mg/l EB

3.3.2. Material

verwendete Stämme:	Serovar 4 b	Serovar 1/2 a
Referenzstämme:	NCTC 10527	SLCC 5581
	SLCC 5633	NCTC 7973
	SLCC 2375	
	SLCC 4013	

aus Käse isolierte

Stämme**:	Nr.4'	Nr.186
	Nr.7'	Nr.187
	Nr.264	
	Nr.295	

Nr. 27*/**

*: Stamm des Institutes für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin der Tierärztlichen Fakultät der LMU München

** : hausinterne Nummerierung

3.3.3. Methodik

Der Versuchsansatz verlief in Anlehnung an die Methode der FDA (LOVETT et al., 1987):

zu 225 ml der Anreicherungsbouillon wurden 25 ml einer keimfreien, 4 %igen Caseinatlösung (als "Probe") gegeben. Dieser Mischung wurde eine durch Gesamtkeimzahlbestimmung (3.1.3.) bekannte Listerienmenge (etwa 1 CFU/ml Mischung, Abb. 14-20) anschließend zugegeben.

Unter üblichen Bebrütungsbedingungen (30 °C) wurden Listerienzahlbestimmungen der verschiedenen Stämme bei unterschiedlichen Acriflavinkonzentrationen (3.3.1.) nach 24 h, 48 h und 7 Tagen auf TSA-YE-Agar (Bebrütung: 24 h bei 35 °C) durchgeführt; die Verdünnungsstufen reichten von der Ausgangsbouillon bis zu 10^{-7} .

Als Null-Wert (Kontrolle) fungierte die Anreicherungsbouillon mit der Caseinatlösung samt Listerienzugabe, jedoch ohne Supplemente.

3.3.4. Ergebnisse

Bei Betrachtung der Wachstumskurven (Abb. 14-20: Abszisse: Zeit in Tagen; Ordinate: $\log_{10}$ CFU/ml) fällt auf, daß bei allen untersuchten Stämmen das Keimwachstum schon durch Einsatz von 15 mg Acriflavin/l EB bei Messung am 1. Tag gegenüber der Kontrolle deutlich vermindert war. Von neun untersuchten Stämmen der Sero-var 4 b zeigten drei Stämme (zwei Referenzstämme, ein aus Käse isolierter Stamm) schon bei Einsatz der doppelten Acriflavinkonzentration der Methode der FDA (30 mg/l EB) selbst nach 7 Tagen Bebrütungszeit keine meßbare Vermehrung, selbst wenn die Ausgangskeimzahlen höher als die anderer Stämme lagen.

Dies ist in Abb. 14 (Stamm NCTC 10527), Abb. 15 (Stamm SLCC 2375) und in Abb. 17 (Nr. 264) wiedergegeben.

Bei den betrachteten vier Stämmen der Sero-var 1/2 a konnte ein derartiger Effekt nicht beobachtet werden, wohl aber einmal ein Keimwachstum, das am 2. Tag noch nicht, sondern erst am 7. Tag nachzuweisen war (Stamm Nr. 186; Abb. 20).

Hier muß angefügt werden, daß die Abbildungen nicht den exakten Verlauf des Listerienwachstums widerspiegeln, da die Keimzahlen am Tag 3, 4, 5 und 6 nicht bestimmt wurden.

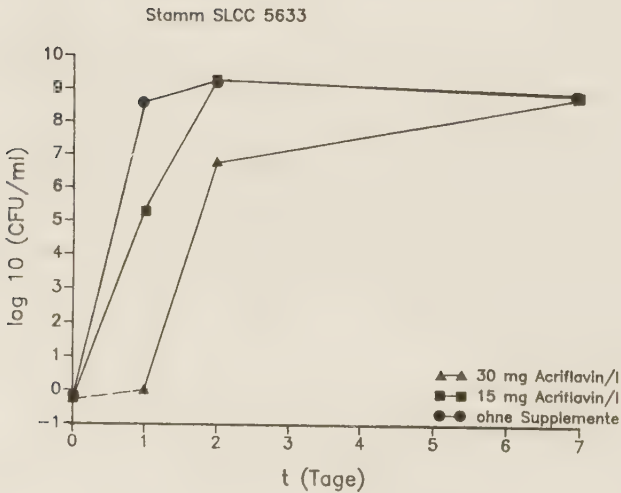
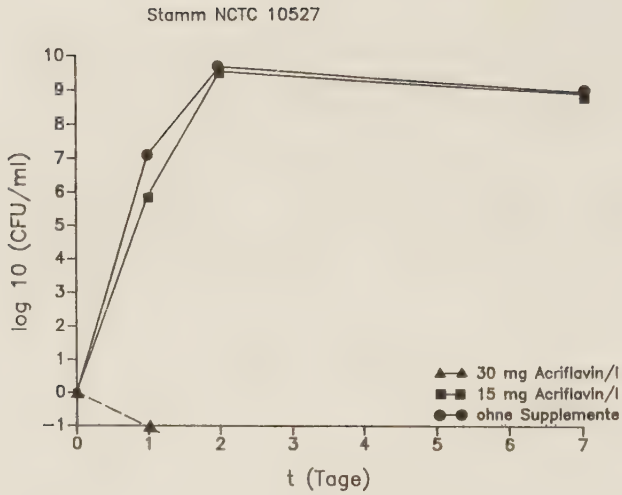


Abbildung 14: Wachstumskurven von *L. monocytogenes*-Kulturen (Sv 4 b) bei verschiedenen Acriflavinkonzentrationen der Anreicherungsbouillon
- - -: keine Listerien nachweisbar

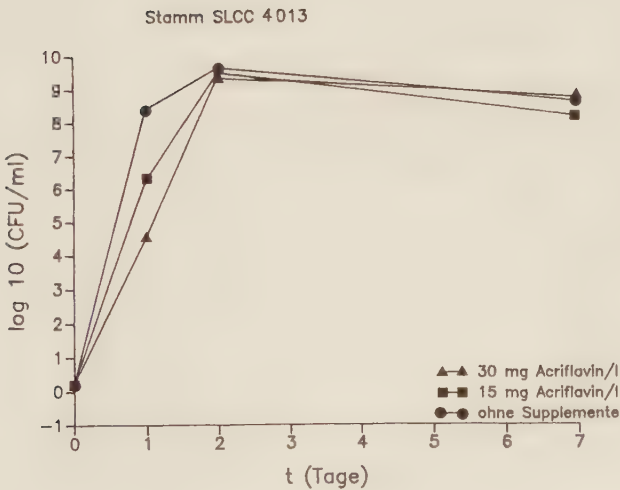
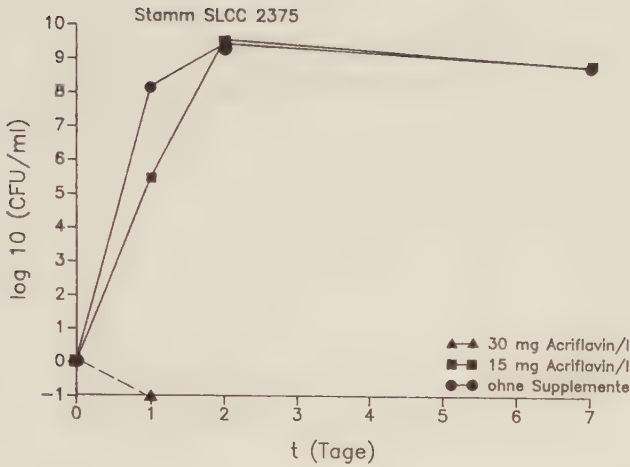


Abbildung 15: Wachstumskurven von *L. monocytogenes*-Kulturen (Sv 4 b) bei verschiedenen Acriflavinkonzentrationen der Anreicherungsbouillon
- - -: keine *Listerien* nachweisbar

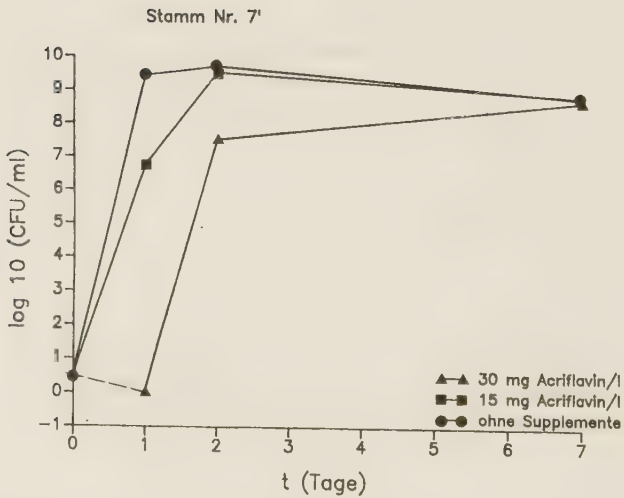
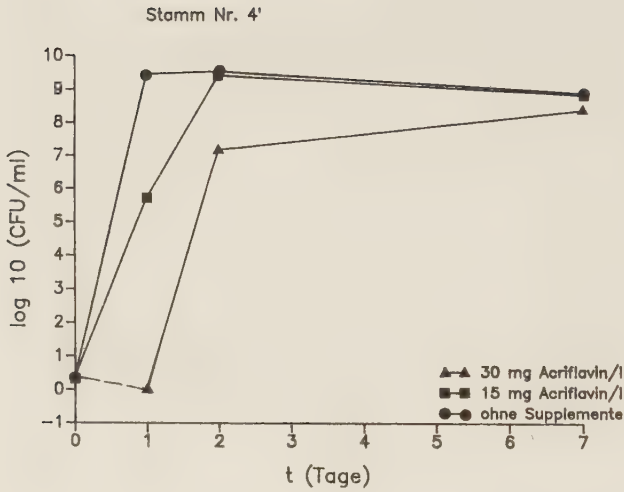


Abbildung 16: Wachstumskurven von *L. monocytogenes*-Kulturen (Sv 4 b) bei verschiedenen Acriflavinkonzentrationen der Anreicherungsbouillon
- - -: keine *Listerien* nachweisbar

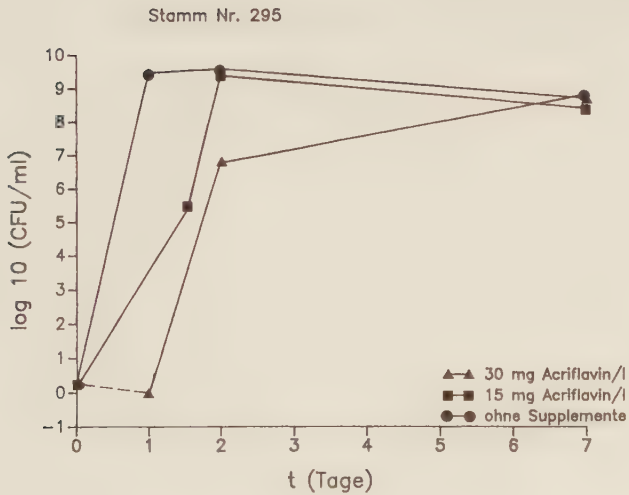
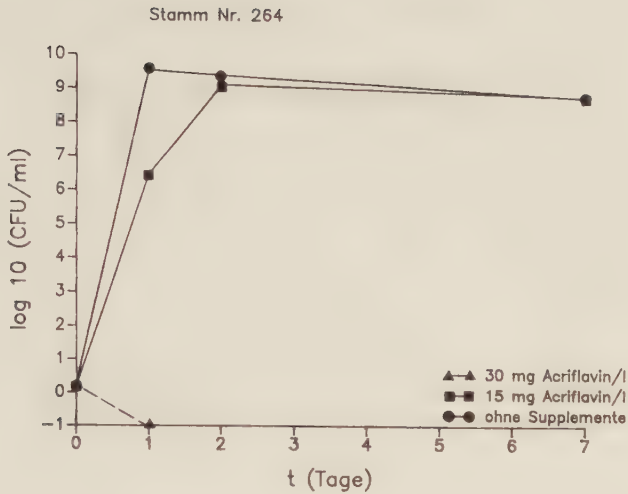


Abbildung 17: Wachstumskurven von *L. monocytogenes*-Kulturen (Sv 4 b) bei verschiedenen Acriflavinkonzentrationen der Anreicherungsbouillon
- - -: keine *Listerien* nachweisbar

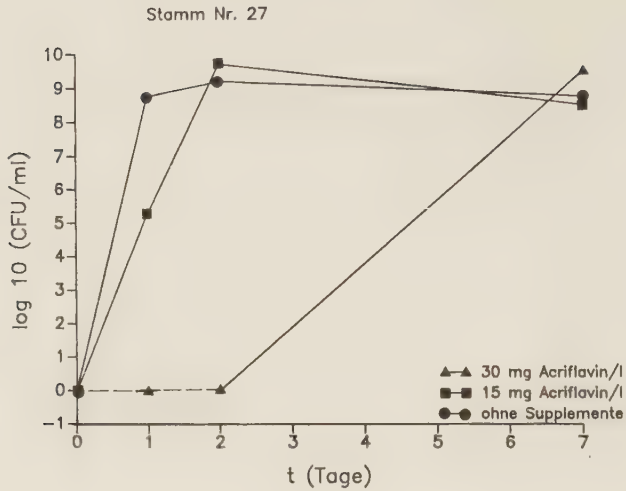


Abbildung 18: Wachstumskurven von *L. monocytogenes*-Kulturen (Sv 4 b) bei verschiedenen Acriflavinkonzentrationen der Anreicherungsbouillon
- - -: keine *Listerien* nachweisbar

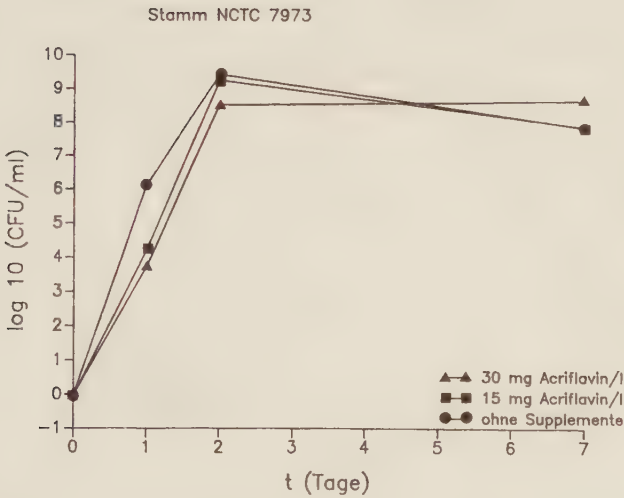
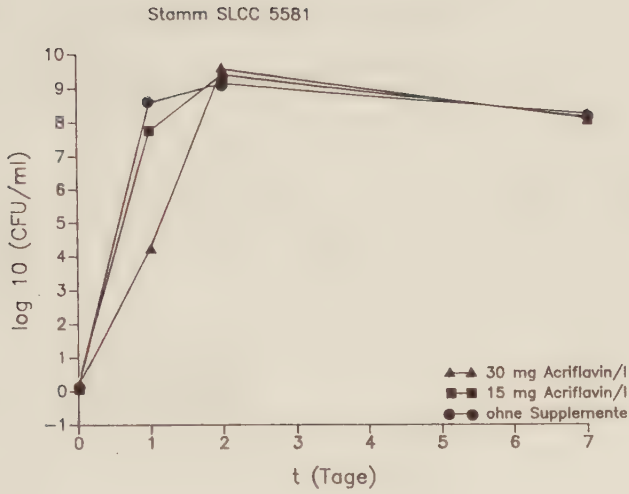


Abbildung 19: Wachstumskurven von *L. monocytogenes*-Kulturen (Sv 1/2 a) bei verschiedenen Acriflavinkonzentrationen der Anreicherungsbouillon

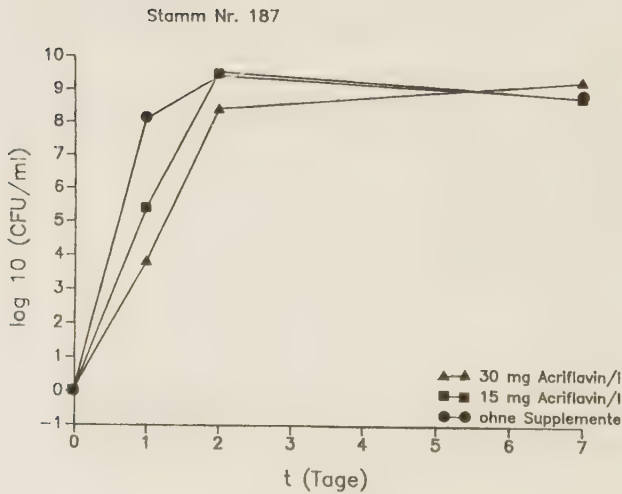
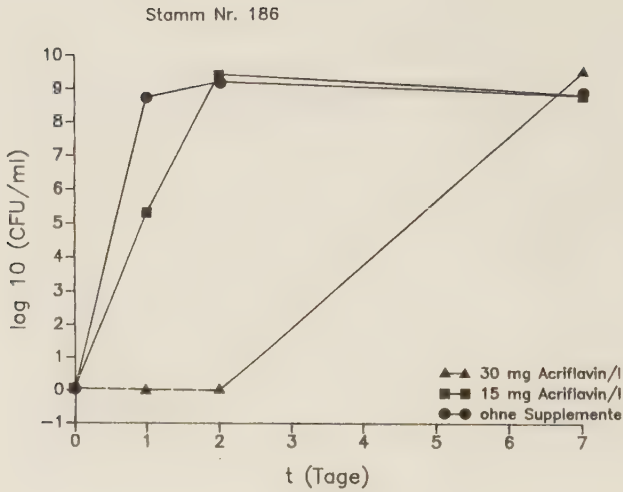


Abbildung 20: Wachstumskurven von *L. monocytogenes*-Kulturen (Sv 1/2 a) bei verschiedenen Acriflavinkonzentrationen der Anreicherungsbouillon
- - -: keine *Listerien* nachweisbar

4. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE UND DISKUSSION

4.1.

Die US Food and Drug Administration sieht in ihrer Nachweismethode für isolierte Listerienstämme u. a. den Mäusetest vor, um pathogene von apathogenen Stämmen zu trennen.

Ein Ziel dieser Arbeit war es, eine Alternative zu diesem Test zu entwickeln, die Zeit und Kosten spart und auch tierschutzgerechter ist. Der Pathogenitätstest am bebrüteten Hühnerei könnte eine solche Alternative darstellen. Es wurden in den Versuchen zwei unterschiedliche Methoden gewählt: die Inokulation in den Dottersack (DS) des 7 Tage alten Hühnerembryos und die Beimpfung der Chorionallantoismembran (CAM) des 10tägig bebrüteten Hühnereies.

Die Beimpfung der CAM von Hühnerembryonen mit Listerienstämmen läßt bereits nach 72 h erkennen, wenn 100 % der Embryonen abgestorben sind, daß ein pathogener Stamm (*L. monocytogenes*, *L. ivanovii*) vorliegt. Apathogene Stämme zeigten in dieser Zeitspanne Absterbequoten von 0 bis 11,7 %; es starben aber nie mehr als zwei der fünf pro Stamm beimpften Embryonen.

Die Inokulation in den DS am 7. Bebrütungstag erwies sich als nicht geeignet, da auch mit apathogenen Stämme beimpfte Embryonen Absterbequoten bis zu 100 % aufwiesen.

Der DS stellt wohl einen idealen Nährboden für Listerien dar, so daß sich auch apathogene Stämme ungehindert vermehren konnten und (vielleicht) durch ihre Stoffwechselprodukte oder/und den Nahrungsentzug zu den, im Vergleich zur CAM-Beimpfung, hohen Absterbequoten führten. Eine weitere Erklärung könnte sein, daß die unspezifische (Interferonbildung, embryo-produzierte Inhibitoren) und die spezifische Abwehr im Hühnerembryo (zellulär und humoral) vor allem ab der zweiten Bebrütungshälfte einsetzen (SIEGMANN, 1953) und sich so auch apathogene Listerien gut vermehren konnten. Diese Änderung im Abwehrstatus des Hühnerembryos zeigten auch SEGRE et al. (1956). Sie erhielten bei Beimpfung der Allantois eine LD₅₀ von 1,8 CFU für den 7 Tage alten Hühnerembryo; die LD₅₀ für den 14 Tage alten Hühnerembryo betrug aber schon 11 CFU.

Daraus ist ersichtlich, wie sehr der Ausgang dieses "Tierversuches" nach KAUTTER et al. (1962) vom gewählten Versuchstier,

dessen Alter und auch der Infektionsroute abhängt.

Die Abtötung durch apathogene Stämme zeigte sowohl bei Beimpfung des DS als auch der CAM eine Häufung in den ersten 48 h nach der Inokulation im Vergleich zu den unbeimpften Kontrolleiern.

Möglicherweise beruht diese unspezifische Wirkung auf bei der Impfung gesetzte Läsionen, z. B. Anstechen eines Gefäßes, da auch mit steriler Bouillon (mit Ringerlösung verdünnt) beimpfte Embryonen in dieser Zeit Absterbequoten von 10 % (CAM-Beimpfung) bzw. 15 % (DS-Beimpfung) zeigten.

L. seeligeri-Stämme, für die in der Literatur keine Angaben hinsichtlich ihrer Pathogenität auf Hühnerembryonen zu finden waren, könnten nach ROCOURT und SCHRETTENBRUNNER (1985) leicht mit L. monocytogenes verwechselt werden, da sie übereinstimmende Hämolyseeigenschaften, gleiche Serovarietäten und oft auch gleiche Phagovarietäten besitzen. Durch den Test am bebrüteten Hühnerei können sie nunmehr leicht von pathogenen Stämmen abgegrenzt werden.

Somit zeigt auch dieser Versuch, daß die Pathogenität von Listerienstämmen nicht mehr mit dem von KAMPELMACHER und van NOORLE JANSEN (1972a) beschriebenen Muster (hämolysierender Stamm: pathogen; nicht hämolysierender Stamm: apathogen) übereinstimmt. Die L. monocytogenes von damals entspricht allerdings den heutigen fünf Spezies L. monocytogenes (sensu stricto), L. ivanovii, L. seeligeri, L. innocua und L. welshimeri.

Bemerkenswert ist, daß zur Abtötung von Hühnerembryonen weitaus geringere Keimzahlen (10^2 - 3×10^4) als beim Mäusetest (nach EMÖDY und RALOVICH (1974): LD_{50} : 10^6 - 10^7) nötig sind und somit der Hühnerembryo das empfänglichere und empfindlichere "Versuchstier" darstellt.

Insgesamt betrachtet liefert die Beimpfung der CAM durchaus Ergebnisse, die mit denen des von der FDA geforderten Mäusetests vergleichbar sind. Die Resultate liegen sogar nach noch kürzerer Zeit vor, nämlich nach 72 h. Mäuse, die mit pathogenen Stämmen beimpft werden, sterben hingegen innerhalb von 5 Tagen.

Mit GRAY und KILLINGER (1966) kann man den Eierlest somit wohl als geeignet zum Nachweis der Pathogenität von Listerienstämmen halten, da nach deren Ansicht die hohe Empfänglichkeit von Hühnerembryonen umgekehrt proportional zur deren Größe, Kosten und

Unterhaltsaufwendungen ist.

Wie bereits erwähnt, wurden die fünf Spezies der Gattung *Listeria* jahrelang als *Listeria monocytogenes* (sensu lato) bezeichnet (SEELIGER, 1981). Unter diesen Bedingungen war es nötig, zur Differenzierung die Pathogenität des isolierten Listerienstammes zu bestimmen. Nun schlägt die FDA (LOVETT, 1988) hingegen vor, den Mäusetest nicht mehr routinemäßig durchzuführen, sondern nur noch in unklaren Fällen, wenn z. B. das biochemische Verhalten eines isolierten Stammes für *L. monocytogenes* spricht, die eindeutige Beurteilung der Hämolyse aber Schwierigkeiten bereitet. Es sollte also auf jeden Fall vor dem Pathogenitätstest der Hämolysetest durchgeführt werden.

Der Pathogenitätstest am 10tägig bebrüteten Hühnerei mit Beimpfung der CAM mag unter denselben Voraussetzungen seine Anwendung finden.

Trotzdem wirft die Beurteilung der Pathogenität von Listerienstämmen noch viele ungeklärte Fragen auf: warum z.B. werden einerseits so häufig pathogene Stämme in Lebensmitteln, Umwelt und im Darminhalt von Mensch und Tier gefunden, während andererseits die Erkrankung beim Menschen selten auftritt?

Zweifellos sind die parenterale Verabreichung sowie die Beimpfung der CAM (möglicherweise werden ihre Gefäße bei der Inokulation doch leicht verletzt, so daß die Listerien direkt in den Blutkreislauf gelangen könnten) nicht das adäquate Modell, um das "aktive" Eindringen in den Makroorganismus zu simulieren. Daher versuchten GAILLARD et al. (1987) ein in-vitro-Modell der enteralen Infektion anhand der "human colon carcinoma cell line Caco-2" zu entwickeln. Sie vermuteten, daß *L. monocytogenes* ein "generalisierter intrazellulärer Parasit" ist, der fähig ist, auch in "nicht-phagozytierende" Zellen einzudringen, besonders Epithelzellen, indem er irgendwie seine eigene Phagozytose auslöst, und sich in ihnen vermehrt. Die lebensmittelbedingten Ausbrüche seit 1981 und Krankheitsbilder, wie Zystitis, Konjunktivitis und Pneumonie, die ja durch eine Vermehrung der Listerien in den Epithelzellen bedingt sind, würden nach ihrer Ansicht einen derartigen Infektionsweg als wahrscheinlich erscheinen lassen. Sie konnten zeigen, daß *L. monocytogenes* in die "enterozytenähnlichen" Caco-2-Zellen eindrang und sich auch dort vermehrte.

Zumindest müßte geprüft werden, ob die Stämme, die sich im Tierversuch bei i.v./i.p.-Verabreichung als pathogen erwiesen haben, auch im Fütterungsversuch eine Erkrankung auslösen können.

Man muß allerdings bedenken, daß gesicherte Befunde über die Eintrittspforten der Listerien und deren Ausbreitung im menschlichen und tierischen Organismus bei natürlichen Infektionen bisher kaum vorliegen.

Nach LEHNERT (1964) erfolgt die Infektion bei Tieren mit *L. monocytogenes* bei der septikämischen und metrogenen Verlaufsform i. d. R. durch die orale Keimaufnahme mit dem Futter. Mit GAILLARD et al. (1987) könnte man sich eine Aufnahme in die Intestinalepithelien mit anschließender Vermehrung vorstellen; diese Keimvermehrung würde den Listerien auch die Möglichkeit geben, die Makrophagen der Lamina propria zu überwinden. Die Vermehrung in den Makrophagen der Leber und Milz mit anschließender Zerstörung dieser Freßzellen führt zur Steigerung der zellulären Abwehr. Nach GALSWORTHY und FEWSTER (1988) soll dafür "Monocytosis Producing Activity" (MPA) verantwortlich sein, eine Substanz, die der Zytoplasmamembran von *L. monocytogenes* entstammen soll und die Bildung der Zellen des mononukleären Phagozytosesystems stimuliert.

Van FURTH et al. (1988) beschreiben einen Faktor, genannt "Factor Increasing Monocytopoiesis" (FIM). Er stellt ein Protein dar, das von Makrophagen als Reaktion auf *Listeria*-Antigen gebildet und sezerniert wird und ebenfalls zu einer Erhöhung der Monozytopoese führt.

Nach der weiter oben beschriebenen Zerstörung der Makrophagen (durch Vermehrung und Bildung von Hämolyisin) können die Listerien nun andere Zielorgane, wie graviden Uterus, Haut oder Zentralnervensystem (ZNS) besiedeln.

Die Listeriose des ZNS muß sich aber nicht aus einer hämatogenen Verbreitung heraus entwickeln. So konnten ASAHII et al. (1957) bei Versuchstieren (kleine Wiederkäuer) nach Applikation von Listerien auf verletzte Schleimhäute des Kopfes eine aufsteigende Neuritis des N. trigeminus und typische entzündliche Gehirnveränderungen erzeugen, ohne daß Listerien in anderen Organen oder im Blut nachzuweisen waren.

Die lebenden Bakterien, die sich in den Makrophagen bzw. Monozyten vermehren, scheinen dadurch nach BERCHÉ et al. (1987) die T-Zellen, Träger der zellgebundenen Immunität, zu sensibilisieren.

Letztere bilden nun ein Lymphokin, genannt MAF (macrophage activating factor) (MIELKE et al., 1988), das zum vermehrten Austritt von Monozyten des Blutes in die bakteriell verursachten Läsionen, z. B. in der Leber, und zur Aktivierung, d. h. einer Erhöhung der bakteriziden Aktivität, einer hohen Anzahl von Makrophagen in den infizierten Herden und damit zur raschen Abtötung der Bakterien führt (BERCHE et al., 1988).

Was die Versuche zur oralen Infektion mit Listerien betrifft, so konnten GAILLARD et al. (1987) zeigen, daß eine nichthämolytische Variante von *L. monocytogenes* (durch "transposon mutagenesis" entwickelt) von Darmzellen zwar phagozytiert wird, sich aber nicht wesentlich vermehren konnte, im Gegensatz zur hämolytischen Form (sowie *L. ivanovii*). *L. innocua*, *L. seeligeri* und *L. welshimeri* waren nicht einmal in der Lage, in die Zellen einzudringen.

Der Virulenzfaktor Hämolysin allein als Erklärung für die Pathogenität von Listerienstämmen genügt nicht mehr, da auch die an-hämolytische Form von *L. monocytogenes* vom Enterozyten aufgenommen wurde. Somit stellt sich die Frage nach Erkennungsstrukturen an der Zellwand des Bakteriums für die Zellrezeptoren, die sich an der Oberfläche von Monozyten und Makrophagen befinden.

In diesem Zusammenhang sei erwähnt, daß einer der vier im Pathogenitätstest am bebrüteten Hühnerei gesondert beobachteten apathogenen *L. monocytogenes*-Stämme auf die Zusammensetzung seiner Zellwandbestandteile hin untersucht worden ist. Dabei wies er im Teichonsäurenmuster der Zellwand kein Glucosamin auf (FIEDLER, 1988). Ob dies allerdings hinsichtlich der Pathogenität wesentlich ist, muß noch offen bleiben.

Die Virulenz bzw. Pathogenität von Listerien stellt sich somit als ein vielschichtiges Problem dar und auch anderen Faktoren wie lipolytischen Enzymen (JENKINS und WATSON, 1971) oder der Produktion von Katalase und Superoxiddismutase durch pathogene Stämme (GODFREY und WILDER, 1985) mag durchaus noch ihre Bedeutung zukommen. So konnten letztgenannte Autoren bei virulenten *L. monocytogenes*-Stämmen eine hohe Aktivität der Katalase und Superoxiddismutase nachweisen, die es den Keimen ermöglichte, die mikrobiziden Eigenschaften der Monozyten bzw. Makrophagen, nämlich die Superoxidionen und das Hydrogenperoxid, zu inaktivieren.

4.2.

Im Zusammenhang mit dem Listerioseausbruch 1983 in Massachusetts, bei dem pasteurisierte Milch als Infektionsquelle vermutet worden war, ohne daß jedoch die Keime in der Milch nachgewiesen werden konnten, fand die Hypothese, daß Listerien, die intrazellulär in Leukozyten vorliegen, eine erhöhte Hitzeresistenz aufweisen, besondere Beachtung (FLEMING et al., 1985). Diese theoretische Überlegung und zahlreiche widersprüchliche Angaben zur Hitzeresistenz in der Literatur waren der Anlaß zu Erhitzungsversuchen sowohl mit frei suspendierten als auch mit phagozytierten Listerien in Rohmilch.

Zur Gewinnung zellreicher Milch wurde die vermehrte Ausscheidung von weißen Blutkörperchen insbesondere polymorphkernigen Granulozyten aus Gründen des Tierschutzes mit physiologischer Kochsalzlösung durchgeführt, die geringe Mengen eines L. monocytogenes-Filtrates enthielt. Einige Autoren hatten dazu Endotoxin (BUNNING et al., 1988) oder Listerienkulturen ins Euter (DOYLE et al., 1987) injiziert. Bei intramammärer Applikation von Listerienkulturen ins Euter hätte u. U. mit dem Verlust der betreffenden Kühe gerechnet werden müssen, was auch aus finanziellen Gründen nicht vertretbar war, zumal die Phagozytose in vitro ein für die Versuche ausreichendes Angebot an phagozytierten Listerien ermöglichte.

Die Ergebnisse der Erhitzungsversuche dieser in vitro phagozytierten Listerien in Rohmilch ergeben keinen Hinweis darauf, daß Listerien die Pasteurisierung, geschützt durch die intrazelluläre Lage, überleben könnten.

Es wurden nur in einem der drei Ansätze (Nr. 2) in der Unteranreicherung (sowohl nach 24 h als auch nach 7 Tagen Bebrütung) nach Erhitzung bei 69 °C für 15 s noch Listerien nachgewiesen, niemals bei 72 oder gar 76 °C, obwohl Listerienzahlen von 6×10^6 bis 7.8×10^7 vorlagen. Unterschiedlichen Voranreicherungen bei einem der Versuche (Nr. 3) erbrachten keine Verbesserung des Nachweises; der direkte Ausstrich nach der Erhitzung ergab gleiche Isolierungen wie die modifizierten Voranreicherungen. Dies stimmt mit den Ergebnissen von BUNNING et al. (1988) überein, die keinen großen Unterschied im Nachweis hitzegeschädigter Listerien ausmachen

konnten, egal ob sie die erhitzte Milch direkt ausstrichen oder sie voranreicherten.

BUCHANAN et al. (1988) weisen allerdings eindringlich darauf hin, daß subletal geschädigten Keimen, z. B. durch Hitzeeinwirkung, unbedingt eine genügend lange unselektive Voranreicherung ermöglicht werden muß, damit sie die Möglichkeit haben, ihre "Schäden" reparieren zu können.

Vermutlich spielte die Hitzeschädigung bei den hohen Keimzahlen - auch BUNNING et al. (1988) arbeiteten mit Listerienzahlen um 10^6 /ml Milch - in eigenen Versuchen keine Rolle.

Die D-Wert-Bestimmungen für verschiedene Listerienstämme wurden durchgeführt, um überhaupt einmal abschätzen zu können, wieviel Listerien in der Rohmilch enthalten sein müßten, damit sie die untere Grenze der in Europa üblichen Milchpasteurisierung (71-72 °C, 15 s) überleben könnten.

Die Entwicklung der Methodik des Versuchsansatzes zur D-Wert-Bestimmung warf einige Probleme auf: einerseits sollte das Volumen der Erhitzungsgefäße und deren Wanddicke möglichst gering sein, um eine gleichmäßige Erwärmung aller Listerien zur selben Zeit zu erhalten, andererseits sollte aber auch die Keimzahl der Überlebenden möglichst zuverlässig und genau zu bestimmen sein.

So stellen die in eigenen Versuchen eingesetzten kleinen Glasröhrchen einen Kompromiß dar aus Kapillaren, die nur ein ganz geringes Volumen aufnehmen können, und Reagenzröhrchen, die den Nachteil aufweisen, daß das Erhitzungsgut in der Mitte der Flüssigkeitssäule langsamer erwärmt wird als das der an die Reagenzglaswand angrenzenden Schichten.

Diese verschlossenen Glasröhrchen hatten zudem noch den Vorteil, völlig im Wasser versenkt werden zu können, und so konnten - anders als bei Reagenzröhrchen - keine Keime am oberen Rand des Glases der Erhitzung entgehen.

Die ermittelten Absterbekurven der Listerienstämme wiesen in den Versuchen einen annähernd geraden Verlauf auf; dies bestätigen auch die Korrelationskoeffizienten der Tab. 18.

Ergibt die Absterbekurve eine Gerade, so verläuft nach CHRISTOPHERSEN (1973) die Abtötung der entsprechenden Bakterien exponentiell und die Population erweist sich damit als gleichmäßig hitzeempfindlich. Er begründet den linearen Verlauf mit der Inaktivierung eines kritischen Punktes der Bakterienzelle und

schließt daraus, daß die Hitzeabtötung von Bakterien den Regeln einer Reaktion erster Ordnung folgt. Konvexe Kurven schreibt er einer Verklumpung von Bakterien zu Erhitzungsbeginn und daraus resultierenden Fehlern bei der Keimzahlbestimmung zu; er zieht aber auch eine Inaktivierung mehrerer kritischer Punkte an der Bakterienzelle in Betracht. Konkave Kurven interpretiert er als Ausdruck einer unterschiedlichen Thermoresistenz der Kultur. Einen weiteren Einfluß auf den Kurvenverlauf hat auch das Alter der Kultur. So sind Keime unmittelbar nach der Teilung hitzeempfindlicher als davor.

Die für 71 °C ermittelten D-Werte lagen im Bereich von 1.6-2.7 s (experimentell) bzw. 1.1-2.4 s (extrapoliert). Der extrapolierte D-Wert für 71 °C wurde errechnet, da die experimentelle Bestimmung der Abtötungskurve mit abnehmender Erhitzungszeit aber steigender Temperatur immer ungenauer wird. Die ermittelten Wertepaare (experimenteller/extrapolierter D-Wert) unterschieden sich jedoch nicht wesentlich.

Die Unterschiede zwischen den D-Werten der verschiedenen Stämme bei gleicher Erhitzungstemperatur waren statistisch nicht auswertbar.

Der höchste, experimentell ermittelte, $D_{71\text{ °C}}$ -Wert lag bei 2.7 s. Dies bedeutet, daß mehr als $10^{5.5}$ Listerien/ml in der Milch enthalten sein müßten, damit die Keime diese Temperatur für die Dauer von 15 s überleben können. LOVETT et al. (1987) fanden aber bei Rohmilchproben in Sammeltanks nur Listerienmengen, die unter einem Keim pro Liter Milch lagen. Genaue Angaben über das Vorkommen von Listerien in der Rohmilch sind bei GASPAROVIC (1988) aufgeführt. Danach waren in untersuchten Rohmilchproben im allgemeinen nur selten *L. monocytogenes* zu finden.

Er selbst überprüfte 635 Bestands-Rohmilchproben aus Sammeltanks und konnte *L. monocytogenes* in zwei Fällen (0.3 %) isolieren.

Wenn man also diese äußerst niedrigen Keimmengen bei einem insgesamt seltenen Vorkommen betrachtet, erscheint ein Überleben der Listerien in pasteurisierter Milch praktisch unmöglich.

Von einem Expertengremium der WHO (1988) wurde die Pasteurisierung (71.7 °C, 15 s) inzwischen als sicheres Verfahren bezeichnet, um Listerien abzutöten.

Doch wie lassen sich die äußerst unterschiedlichen Angaben zur Hitzeresistenz in der Literatur erklären?

Man kann die verantwortlichen Faktoren vielleicht nach Material und Methodik gliedern.

Vergleicht man die Versuche der FDA (BRADSHAW et al., 1985; BUNNING et al., 1988) hinsichtlich "Material", kommt es anscheinend auf den Stamm an, der eingesetzt wird; so ergaben diese Versuche der FDA $D_{71.7}^{\circ C}$ -Werte von 0.9-4.1 s, je nach Stamm.

Betrachtet man dazu die Literatur über Erhitzungsversuche (Tabb. 2 bis 6), so scheint das Erhitzungsmedium ebenfalls eine Rolle zu spielen, d.h., ob z.B. rohe Milch oder erhitzte Milch verwendet wird, genauso wie es wesentlich ist, ob die Listerien frei suspendiert oder phagozytiert in weißen Blutkörperchen in der Milch vorliegen.

Was die "Methodik" anbelangt, so verglichen DONNELLY et al. (1987) die Hitzeresistenz in offenen Röhrchen mit der von zugeschnittenen Röhrchen, wobei sie drastische Unterschiede erhielten und die "open test tube methodology" für ungeeignet zum Nachweis der Hitzeresistenz erklärten. Soweit es die vielbeachteten Experimente von DOYLE et al. (1987) betrifft, arbeiteten diese Autoren nach Ansicht von DONNELLY (1988) mit abnorm hohen Listerienggehalten und einer hohen Gesamtkeimzahl in der Milch künstlich infizierter Kühe, so daß Listerien $72.2^{\circ C}$ für 16.4 s überlebten. Diese hohe Gesamtkeimzahl spielt für die Hitzeinaktivierung der Listerien insofern eine Rolle, als dadurch die "Trefferquote" der Abtötung für Listerien bei der Erhitzung geringer ausfällt. DOYLE et al. (1987) konnten bei $76.4-77.8^{\circ C}$ für 15.4 s hingegen keine überlebenden Listerien mehr nachweisen. Aus den Versuchen von DOYLE et al. (1987) folgte DONNELLY (1988) andererseits aber auch, daß der Listeriose-Ausbruch in Boston, Massachusetts (FLEMING et al., 1985), der pasteurisierter Milch zugeschrieben wurde, nicht durch überlebende Listerien ausgelöst worden sein kann, da die Milch in der betreffenden Anlage auf $76.7^{\circ C}$ für 19.5 s erhitzt worden war. Außerdem wurde der Serotyp, der aus klinischem Material isoliert worden war, weder in der Rohmilch, noch in der pasteurisierten Milch gefunden. DONNELLY (1988) bewertet auch die Studien von FERNANDEZ-GARAYZABAL et al. (1986) kritisch: ihrer Meinung nach müssen für die abnorm hohen L. monocytogenes-Zahlen in der pasteurisierten Milch (21.4 %

der pasteurisierten Milchproben), bei einer Erhitzung von 78 °C für 15 s, andere Faktoren als das Überleben dieser Pasteurisierung verantwortlich sein.

NORTHOLT et al. (1988) denken dabei an Schäden in der Plattenpasteurisierungsanlage, so daß sich Rohmilch mit schon pasteurisierter mischen konnte bzw. an spätere Kontamination.

Insgesamt betrachtet kann man aus den Ergebnissen der Erhitzungsversuche wohl folgern, daß in pasteurisierter Milch oder daraus hergestellten Produkten vorhandene Listerien - eine ordnungsgemäße Pasteurisierung vorausgesetzt - aus einer nachträglichen Kontamination stammen, während das Risiko des Überlebens der Pasteurisierung praktisch vernachlässigt werden kann.

Listerienhaltige Rohmilch, in den meisten Fällen vermutlich eher die Folge einer Kontamination (Futter, Fäces) als einer Listerienmastitis, könnte höchstens bei aus roher Milch hergestellten Produkten, insbesondere Käse, in Erwägung gezogen werden.

BREER (1986) und TERPLAN et al. (1986) zeigten, daß Rohmilchkäse und Käse aus pasteurisierter Milch gleichermaßen vom Listeria-Problem betroffen sind, wobei bei ersteren die Kontaminationsquellen, die für Käse aus pasteurisierter Milch ermittelt wurden, ebenfalls in erster Linie in Betracht kommen.

4.3.

Wie eingangs schon erwähnt, wurde an unserem Institut aus Käse vorwiegend die Serovar 1/2 a isoliert. Auch SCHÖNBERG (1987) machte die Beobachtung, daß am BGA, Berlin, aus Lebensmittelproben vorwiegend die Serovar 1/2 a isoliert wurde. Nach seinen Aussagen, die sich auf die Bundesrepublik Deutschland und England beziehen, ruft aber die Serovar 4 b zwei Drittel der Infektionen, die Serovar 1/2 a hingegen nur ein Drittel hervor. Ganz ähnliche Berichte liegen auch aus Frankreich vor. So stellte BIND (1988) die Stämme, die im Jahre 1986 aus Fällen menschlicher Listeriose in Frankreich isoliert wurden (29.85 % des Serotyp 1 sowie 68.66 % des Serotypes 4 von *L. monocytogenes*), den in Milchprodukten (Zeitraum 1986-87) nachgewiesenen gegenüber. Letztere verteilten sich zu 13.83 % auf den Serotyp 4 und zu 86.17 % auf den Serotyp 1.

Für die Beurteilung des allgemeinen Risikos war es wesentlich festzustellen, ob die beiden Serotypen möglicherweise durch die Selektivität der Nährböden in unterschiedlichem Maße isoliert werden und die Dominanz der Sero var 1/2 a das Ergebnis einer größeren Empfindlichkeit der Sero var 4 b gegenüber Acriflavin ist.

In einer Versuchsreihe (3.3.4.) wurden einige Stämme der Serotypen 4 b und 1/2 a von *L. monocytogenes* hinsichtlich der Empfindlichkeit gegenüber dem Hemmstoff Acriflavin untersucht.

Die Ergebnisse zeigen, daß 15 mg Acriflavin/l selektiver Anreicherung, wie sie in der z.Z. noch gebräuchlichsten Methode der FDA vorgesehen sind, das Wachstum der Sero var 4 b nicht stärker als das der Sero var 1/2 a beeinflussten.

Allerdings zeigten beide Serotypen bei Keimzahlbestimmung am ersten Tag eine deutliche Wachstumshemmung, die sich in einer geringeren Zunahme der Keimzahlen im Vergleich zur Null-Kontrolle um 4 Zehnerpotenzen (Stamm 4', Sv 4b) bzw. 3.5 Zehnerpotenzen (Stamm Nr. 186, Sv 1/2 a) ausdrückte.

Überimpfungen, die am ersten Tag nach Probenansatz vorgenommen werden, könnten bei keimarmem Ausgangsmaterial zu falschnegativen Ergebnissen führen, da die *Listerien* sich durch die acriflavinbedingte Hemmung noch nicht soweit vermehren konnten und die Keimzahlen unter einem Keim in den für die Unteranreicherung benötigten 0.1 ml (Methode der USDA nach McCLAIN und LEE, 1988) liegen. Es wäre also zu prüfen, ob es geeigneter ist, die Acriflavinkonzentration in der Hauptanreicherung zu senken oder den Überimpfungsschritt 24 h später vorzunehmen. Nach 48 h Bebrütung wurden nämlich bei Einsatz von 15 mg Acriflavin den Null-Kontrollen entsprechende, wenn nicht sogar ganz leicht erhöhte *Listerien*-zahlen ermittelt. Dieses Vorgehen würde jedoch in der Routinediagnostik einen Tag Zeitverlust bedeuten und das Wachstum der kompetitiven Flora, insbesondere Enterokokken begünstigen.

Bei Einsatz der doppelten Acriflavinkonzentration der Methode der FDA (30 mg/l Anreicherungsflüssigkeit) zeigten drei von neun Stämmen der Sero var 4 b selbst nach 7 Tagen Bebrütung keine meßbare Vermehrung, während ein derartiger Effekt bei der Sero var 1/2 a nicht beobachtet werden konnte.

Die Methode der USDA (McCLAIN und LEE, 1988) fordert in ihrer Unteranreicherung 25 mg Acriflavin/l Anreicherungsbouillon; es

wäre denkbar, daß sich hier eine Wachstumshemmung bei Stämmen der Sero var 4 b einstellt, besonders im Hinblick darauf, daß durch den Überimpfungsschritt die "entgiftende Wirkung des Käseweißes" (GÖTZ, 1987) wegfällt und sich somit die für die Listerien zur Verfügung stehende Hemmstoffmenge relativ erhöht. Sieht man von der doch geringen Probenanzahl dieser Versuchsreihe ab, scheinen einige Stämme der Sero var 4 b schon empfindlicher gegen das zugesetzte Supplement Acriflavin zu sein. BEUMER et al. (1988) gehen sogar soweit zu behaupten, daß die Chance, *L. monocytogenes*, Sero var 4b von einem Trypaflavin enthaltenden Nährboden zu isolieren, sehr gering ist.

Eine zweite Erklärung für das geschilderte Phänomen, daß die Sero var 1/2 a häufiger in Lebensmitteln gefunden wird, bei Erkrankungen aber vorwiegend 4 b auftritt, könnte eine höhere Virulenz der Sero var 4 b sein, dem HOF und HEFNER (1988) aber widersprechen. Sie beschreiben zwar, daß es starke Virulenzunterschiede in der Spezies *L. monocytogenes* gibt, die aber keine Beziehung zur Sero varietät hätten, wohl aber zum Zellwandaufbau (R- bzw. S-Form) und zur Hämolysinbildungsfähigkeit.

GOEBEL et al. (1988) machten eine interessante Entdeckung: sie untersuchten die Aufnahme rate (Phagozytose) verschiedener Listerienstämme durch Fibroblasten; die Sero var 4 b hatte einen höheren "uptake" in die Zellen als die Sero var 1/2 a. Die Fähigkeit zur Hämolysinbildung spielte dafür keine Rolle, da (durch Transposon Mutagenese erhaltene) nichthämolysierende *L. monocytogenes*-Stämme sich nicht von ihren hämolysierenden Pendanten unterschieden. Die Sero var 3 a von *L. monocytogenes*, sowie *L. innocua* bewirkten kaum Phagozytose. Möglicherweise liegen bei der Sero var 4 b spezielle Strukturen der Zellwand vor, die deren Aufnahme oder Eindringen begünstigen und dadurch das geschilderte Phänomen verursachen.

Die Wissenschaft ist nun aufgerufen, die Methoden der kulturellen Isolierung von Listerien zu verbessern und deren Dauer zu verkürzen. Derartige Untersuchungen sind auch schon im Gange. Da über die Infektionsbedingungen (Infektionsdosis und sonstige Faktoren, die eine Erkrankung bedingen) noch wenig bekannt ist,

wäre es dringend nötig, die Kriterien, die die Pathogenität bzw. Virulenz von Listerienstämmen bedingen, weiter zu untersuchen. Gegenwärtig kann Risikogruppen nur empfohlen werden, bestimmte Produkte zu meiden bzw. zu erhitzen (Fleischwaren; ERDLE, 1988), von bestimmten Käsen die Rinde vor Genuß zu entfernen (SEELIGER, 1987); Salate sollten gut gesäuert werden und der Verbraucher sollte sich beim Umgang mit Geflügel an den für Salmonellen gültigen, hygienischen Maßnahmen in der Küche orientieren.

Die Milchindustrie reagierte als erster Lebensmittelbereich auf das Vorkommen von Listerien im Käse durch freiwillige Selbstkontrolle der Käseherstellungsbetriebe im Rahmen von Statuserhebungen. Weitere Lebensmittelzweige sollten diesem Beispiel folgen.

Andererseits muß aber auch von wissenschaftlicher Seite den Betrieben Anleitung gegeben werden, ihre Kontaminationsquellen zu erkennen, um das Vorkommen von Listerien zumindest zu reduzieren, da eine absolute Eliminierung aus dem Lebensmittelbereich unwahrscheinlich ist.

5. ZUSAMMENFASSUNG

I. Ein Ziel dieser Arbeit war, eine Alternative zum Mäusetest als Pathogenitätsnachweis von aus Lebensmitteln isolierten Listerienstämmen zu entwickeln, um den Einsatz von Versuchstieren zu vermeiden und sowie um Zeit und Kosten zu sparen.

Die Beimpfung der Chorioallantoismembran von 10tägig bebrüteten Hühnerembryonen hat sich als geeignetes Verfahren erwiesen. Alle Embryonen (fünf pro Stamm), die mit pathogenen Spezies (*L. monocytogenes*, *L. ivanovii*) infiziert wurden, starben innerhalb von 72 h ab, während mit apathogenen Spezies (*L. innocua*, *L. seeligeri* und *L. welshimeri*) infizierte überlebten bzw. es starben nie mehr als zwei der fünf infizierten Embryonen ab.

Die Beimpfung des Dottersacks von 7tägig bebrüteten Hühnerembryonen erwies sich als nicht geeignete Methode.

II. Hinsichtlich der Hitzeresistenz von Listerien gibt es viele, z.T. einander widersprechende Ergebnisse, so daß auch Zweifel über die Sicherheit der Milchpasteurisierung auftraten. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zunächst Erhitzungsversuche mit phagozytierten *L. monocytogenes*-Keimen an einer Modellpasteurisierungsanlage durchgeführt. Listerien konnten, trotz der geschützten Lage in Phagozyten, nur nach Erhitzung bei 66 und 69 °C für 15 s nachgewiesen werden, niemals jedoch bei 72 oder 76 °C. Zusätzlich wurden auch die $D_{71\text{ }^{\circ}\text{C}}$ -Werte für fünf *L. monocytogenes*-Stämme bestimmt. Sie lagen zwischen 1.1 und 2.7 s.

Beide Versuche machen deutlich, daß Listerien die in Europa übliche Milchpasteurisierung (71.1 °C, 15 s) nicht überleben können.

III. Der Acridinfarbstoff Acriflavin wird als selektives Agens in der Listeriendiagnostik eingesetzt. Es waren Zweifel an der Eignung dieses Zusatzes in Selektivmedien, zumindest bei der üblichen Konzentration von 15 mg/l Anreicherungsflüssigkeit und darüber aufgekommen, insbesondere sollten Stämme der Serovar 4 b von *L. monocytogenes* im Wachstum gehemmt werden.

In den vorliegenden Versuchen konnte erst bei einer höheren Konzentration (30 mg/l) eine deutliche, z.T. absolute Hemmung festgestellt werden.

SUMMARY EXAMINATIONS ON PATHOGENICITY, HEAT RESISTANCE AND
SENSITIVITY AGAINST ACRIFLAVINE OF LISTERIA STRAINS

I. One aim of this work was to examine an alternative to the mouse pathogenicity test for *Listeria* strains, isolated from foods in order to avoid the use of laboratory animals and to save time and costs.

Inoculation of the chorio-allantoic membrane of 10 days old chick embryos has proved a suitable method: all embryos (five per strain) infected with pathogenic species (*L. monocytogenes*, *L. ivanovii*) died within 72 h; embryos infected with non-pathogenic species (*L. innocua*, *L. seeligeri* and *L. welshimeri*) survived, or at no time more than two of the five infected embryos died, respectively.

The inoculation into the yolk-sac of 7 days old chick embryos has not proved a reliable method.

II. Concerning heat resistance of *L. monocytogenes*, many conflicting reports have been published causing doubts in the safety of the pasteurization of milk. In the scope of this thesis investigations about heat resistance of *L. monocytogenes* internalized in phagocytes of raw milk were carried out with a model-pasteurizer. *Listeria* could be recovered only after heating at 66 and 69 °C for 15 s, and - in spite of heat shielding because of their location within the phagocytes - never at 72 or 76 °C.

In addition the $D_{71}^{\circ C}$ -values of five *L. monocytogenes*-strains have been determined. They ranged from 1.1 to 2.7 s.

Both trials elucidate that *Listeria* cannot survive the pasteurization method commonly used in Europe (71.7 °C, 15 s).

III. The acridine dye acriflavine, used as a selective substance for isolation of *Listeria*, is suspected of affecting the growth of some strains of the serovar 4 b of *L. monocytogenes* at the usual concentration of 15 mg/l enrichment broth and upwards. In the present investigations, this effect could be demonstrated only at a higher concentration (30 mg/l) showing a considerable or a total inhibition.

6. LITERATURVERZEICHNIS

ALOUF, J. E. (1980):

Streptococcal toxins (Streptolysin O, Streptolysin S, erythrogenic toxin).

Pharmac. Ther. 11, 661-717

ALOUF, J. E. und C. GEOFFROY (1984):

Structure activity relationships in sulfhydryl-activated toxins.

In: ALOUF, J. E., F. J. FEHRENBACH, J. H. FREER und J.

JELJASZEWICZ: Bacterial protein toxins, p. 165-171, Academic Press, London, Orlando, San Diego, San Francisco, New York, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo und Sao Paulo

AMTSBERG, G. (1980):

Listerien.

In: BLOBEL, H. und T. SCHLIESSER: Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren, Bd. II, p. 345-438

Gustav Fischer Verlag, Stuttgart und New York

AMTSBERG, G., A. ELSNER, H. A. GABBAR und W. WINKENWERDER (1969):

Die epidemiologische und lebensmittelhygienische Bedeutung der Listerieninfektion des Rindes.

Dtsch. tierärztl. Wschr. 76, 497-501

ANTON, W. (1934):

Kritisch-experimenteller Beitrag zur Biologie des Bacterium monocytogenes.

Zbl. Bakt. I. Orig. 131, 89-103

ARMSTRONG, B. A. und C. P. SWORD (1966):

Electron microscopy of Listeria monocytogenes-infected mouse spleen.

J. Bacteriol. 91, 1346-1355

ASAHI, O., T. HOSADA und Y. AKIYAMA (1957):

Studies on the mechanism of infection of the brain with *Listeria monocytogenes*.

Am. J. vet. Res. 18, 147-157

ASPERGER, H. (1988):

Persönliche Mitteilung

ATHAR, M. A. und H. J. WINNER (1971):

The development of resistance by *Candida* species to polyene antibiotics in vitro.

J. Med. Microbiol. 4, 505-517

AUDURIER, A., P. PARDON, J. MARLY und F. LANTIER (1980):

Experimental infection of mice with *Listeria monocytogenes* and *L. innocua*.

Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur) 131 B, 47-57

BARBER, M. (1939):

A comparative study of *Listerella* and *Erysipelothrix*.

J. Path. Bact. 48, 11-23

BARZA, M. (1985):

Listeriosis and milk.

N. Engl. J. Med. 312, 438-440

BASHER, H. A., D. R. FOWLER, F. G. RODGERS, A. SEAMAN und M. WOODBINE (1984a):

Pathogenesis and growth of *Listeria monocytogenes* in fertile hens' eggs.

Zbl. Bakt. Hyg. A 256, 497-509

DIESELBEN (1984b):

Role of haemolysin and temperature in the pathogenesis of *Listeria monocytogenes* in fertile hens' eggs.

Zbl. Bakt. Hyg. A 258, 223-231

BEARNS, R. E. und K. F. GIRARD (1985):

The effect of pasteurization on *Listeria monocytogenes*.

Can. J. Microbiol. 4, 55-61

BECKERS, H. J. (1988)

Persönliche Mitteilung

BECKERS, H. J., P. S. S. SOENTORO und E. H. M. DELFGOU-van ASCH
(1987):

The occurrence of *Listeria monocytogenes* in soft cheeses and raw
milk and its resistance to heat.

Int. J. Food Microbiol. 4, 249-256

BERCHE, P., J. L. GAILLARD und P. SANSONETTI (1987):

Intracellular growth of *Listeria monocytogenes* as a prerequisite
for in vivo induction of T cell-mediated immunity.

J. Immunol. 138, 2266-2271

BERCHE, P. J. L. GAILLARD und S. RICHARD (1988):

Invasiveness and intracellular growth of *Listeria monocytogenes*.

Infection 16, Suppl. 2, 145-148

BERGER, U. (1975):

Einige Eigenschaften der Keimträgerstämme von *Listeria*
monocytogenes.

Med. Microbiol. Immunol. 161, 215-229

BEUMER, R. R., D. J. van DIJK und J. W. de ROODE (1988):

Influence of different tryptaflavine concentrations on the growth
of *Listeria* in enrichment broth.

Abstract 10th International Symposium on Listeriosis, Pécs, Ungarn

BILLE, J. (1988):

Zur Listeriose-Situation in der Schweiz.

Bulletin des Bundesamtes für Gesundheitswesen 3, 28

BIND, J. L. (1988):

Review of latest information concerning data about repartition of *Listeria* in France.

In: Foodborne Listeriosis.

Report of a WHO Informal Working Group, Genf 1988

BISPING, W. (1957):

Die Listeriose und ihre milchhygienische Bedeutung.

Kieler Milchwirt. Forschungsber. 9, 595-606

BOCKEMÜHL, J. H., P. R. SEELIGER und R. KATHKE (1971):

Acridinfarbstoffe in Selektivnährböden zur Isolierung von *Listeria monocytogenes*.

Med. Microbiol. Immunol. 157, 84-95

BOCKEMÜHL, J., E. FEINDT, K. HÖHNE und H. P. R. SEELIGER (1974):

Acridinfarbstoffe in Selektivnährböden zur Isolierung von *Listeria monocytogenes*.

II. Modifiziertes Stuart-Medium: ein neues

Listeria-Transport-Anreicherungsmedium.

Med. Microbiol. Immunol. 159, 289-299

BRADSHAW, J. G., J. T. PEELER, J. J. CORWIN, J. M. HUNT und R. M. TWEDT (1987):

Thermal resistance of *Listeria monocytogenes* in dairy products.

J. Food Prot. 50, 543-544

BRADSHAW, J. G., J. T. PEELER, J. J. CORWIN, J. M. HUNT, J. T.

TIERNEY, E. P. LARKIN und R. M. TWEDT (1985):

Thermal resistance of *Listeria monocytogenes* in milk.

J. Food Prot. 48, 743-745

BREER, C. (1986):

Das Vorkommen von Listerien im Käse.

Proc. 2nd World Congress Foodborne Infections and Intoxications,

Berlin (West), Vol. 1, p. 230-233

BUCHANAN, R. L., J. L. SMITH, H. G. STAHL und D. L. ARCHER (1988):
Listeria methods development research at the Eastern Regional
Research Center, U. S. Departement of Agriculture.
J. Assoc. Off. Anal. Chem. 71, 651-654

BULLEN, J. J. (1981):
The significance of iron in infection.
Rev. Infect. Dis. 3, 1127-1138

BUNNING, V. K., R. G. CRAWFORD, J. G. BRADSHAW, J. T. PEELER,
J. T. TIERNEY und R. M. TWEDT (1986):
Thermal resistance of intracellular Listeria monocytogenes cells
suspended in raw bovine milk.
Appl. Environ. Microbiol. 52, 1398-1402

BUNNING, V. K., C. W. DONNELLY, J. T. PEELER, E. H. BRIGGS, J. G.
BRADSHAW, R. G. CRAWFORD, C. M. BELIVEAU und J. T. TIERNEY
(1988):
Thermal inactivation of Listeria monocytogenes within bovine milk
phagocytes.
Appl. Environ. Microbiol. 54, 364-370

CHRISTOPHERSEN, J. (1973):
Basic aspects of temperature action on microorganisms.
In: PRECHT, H., J. CHRISTOPHERSEN, H. HENSEL, W. LARCHER,
Temperature and life, p. 3-85
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York

COWART, R. E. und B. G. FOSTER (1981):
The role of iron in the production of hemolysin by Listeria
monocytogenes.
Current Microbiol. 6, 287-290

DATTA, A. R., B. A. WENTZ und W. E. HILL (1988):
Identification and enumeration of beta-hemolytic Listeria
monocytogenes in naturally contaminated dairy products.
J. Assoc. Off. Anal. Chem. 71, 673-675

DEDIE, K. (1955):

Beitrag zur Epizootologie der Listeriose.

Arch. exp. Vet. Med. 9, 251-264

DEDIE, K. und D. SCHULZE (1957):

Die Hitzeresistenz von *Listeria monocytogenes* in Milch.

Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 70, 231-232

DENNIS, S. M. (1975):

Perinatal lamb mortality in Western Australia.

Aust. vet. J. 51, 75-79

DEUTSCHE VETERINÄRMEDIZINISCHE GESELLSCHAFT (DVG) (1980):

Die subklinische Mastitis des Rindes und Vorschläge für
Bundeseinheitliche Richtlinien zu ihrer Bekämpfung.

Anlage 1: Zählung somatischer Zellen in Rohmilch.

Teil 1: Mikroskopische Zählung somatischer Zellen

(Referenzverfahren).

Kiel, 49-52

DIN (Deutsches Institut für Normung) 10 161 Teil 2 (1984):

Mikrobiologische Untersuchung von Fleisch und Fleischer-

zeugnissen; Bestimmung der aeroben Keimzahl bei 30 °C;

Tropfplatten-Verfahren.

DOMINGUEZ RODRIGUEZ, L., J. F. FERNANDEZ GARAYZABAL, E. RODRIGUEZ

FERRI, J. A. VAZQUEZ BOLAND, E. GOMEZ-LUCIA und G. SUAREZ

FERNANDEZ (1987):

Some studies on the ability of *Listeria monocytogenes* to survive
heat treatment.

In: *Listeria and Salmonella*.

Presentations at the Microbiological Week, Brüssel.

Supplement to IDF Circular 3, 31-36

DONKER-VOET, J. (1958):

Serological studies on some strains of *Listeria monocytogenes* especially type IV strains.

In: ROOTS, E. und D. STRAUCH: *Listeriosen*, Symposion 1957, p. 37-44

Paul Parey Verlag, Berlin und Hamburg

DIESELBE (1959):

A serological study on some strains of *Listeria monocytogenes* isolated in Michigan.

Am. J. vet. Res. 20, 176-179

DIESELBE (1962):

My view on the epidemiology of *Listeria* infections.

Proc. 2nd Symposium on *Listeriosis*, Bozeman Montana (1963), 133-139

DIESELBE (1966):

A serological study on some strains of *Listeria monocytogenes*.

Proc. 3rd International Symposium on *Listeriosis*, Bilthoven, 133-137

DIESELBE (1972):

Listeria monocytogenes: some biochemical und serological aspects.

Acta microbiol. Acad. Sci. hung. 19, 287-291

DONNELLY, C. W. (1988):

Listeria und U. S. dairy products: the issues in perspective.

Dairy Food San. 8, 297-299

DONNELLY, C. W. und E. H. BRIGGS (1986):

Psychrotrophic growth and thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* as a function of milk composition.

J. Food Prot. 49, 994-998 u. 1002

DONNELLY, C. W., E. H. BRIGGS und L. S. DONNELLY (1987):

Comparison of heat resistance of *Listeria monocytogenes* in milk as determined by two methods.

J. Food Prot. 50, 14-17 u. 20

DONTENWILL, W. und H. KNOTHE (1956):

Die pathologisch-histologische Diagnose der Listeriose im bebrüteten Hühnerei.

Ärztl. Wschr. 11, 204-206

DOYLE, M. P., K. A. GLASS, J. T. BEERY, G. A. GARCIA, D. J.

POLLARD und R. D. SCHULTZ (1987):

Survival of *Listeria monocytogenes* in milk during high-temperature, short-time pasteurization.

Appl. Environ. Microbiol. 53, 1433-1438

EMÖDY, L. und B. RALOVICH (1974):

Listeria infection in mice.

Proc. 6th International Symposium on Listeriosis, Nottingham
Leicester Univ. Press 1975, 131-138

ERDLE, E. (1988):

Zum Vorkommen von Listerien in Käse, Fleisch und Fleischwaren.
Diss. med. vet., München

FARBER, J. M. und J. I. SPEIRS (1987):

Potential use of continuous cell lines to distinguish between pathogenic and nonpathogenic *Listeria* spp..

J. Clin. Microbiol. 25, 1463-1466

FARBER, J. M., G. W. SANDERS, D. B. EMMONS und R. C. McKELLAR (1987):

Heat resistance of *Listeria monocytogenes* in artificially-inoculated and naturally-contaminated raw milk.
74th Annual Meeting of the International Association of Milk, Food and Environmental Sanitarians, Inc.

Ref. in : J. Food Prot. 50, 441

FERNANDEZ-GARAYZABAL, J. F., L. DOMINGUEZ-RODRIGUEZ, J. A.

VAZQUEZ BOLAND, J. L. BLANCO CANCELO und G. SUAREZ FERNANDEZ (1986):

Listeria monocytogenes dans le lait pasteurisé.

Can. J. Microbiol. 32, 149-150

FIEDLER, F. (1988):

Persönliche Mitteilung

FIEDLER, F. und J. SEGER (1983):

The murein types of *Listeria grayi*, *Listeria murrayi* and *Listeria denitrificans*.

System. Appl. Microbiol. 4, 444-450

FLAMM, H. (1955):

Die patho-histologische Diagnose der Listeriose im Tierversuch.
Schweiz. Z. Path. Bakt. 18, 270-277

FLAMM, H. und G. ZEHETBAUER (1956):

Die Listeriose des Auges im Tierversuch.

v. Graefes Arch. Ophthalmol. 158, 122-135

FLEMING, D. W., S. L. COCHI, K. L. MacDONALD, J. BRONDUM, P. S. HAYES, B. D. PLIKAYTIS, M. B. HOLMES, A. AUDURIER, C. V. BROOME und A. L. REINGOLD (1985):

Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis.

N. Engl. J. Med. 312, 404-407

FRASER, J. A. und W. H. SPERBER (1988):

Rapid detection of *Listeria* spp. in food and environmental samples by esculin hydrolysis.

(im Druck)

FUKUHARA, H. und C. KUJAWA (1970):

Selective inhibition of the in vivo transcription of mitochondrial DNA by ethidium bromide and by acriflavin.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 41, 1002-1008

GAILLARD, J. L., P. BERCHE und P. SANSONETTI (1986):

Transposon mutagenesis as a tool to study the role of hemolysin in the virulence of *Listeria monocytogenes*.

Infect. Immun. 52, 50-55

GAILLARD, J. L., P. BERCHE, J. MOUNIER, S. RICHARD und P. SANSONETTI (1987):

Penetration of *Listeria monocytogenes* into the host: a crucial step of the infectious process.

Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur) 138, 259-264

GALSWORTHY, S. B. und D. FEWSTER (1988):

Comparison of responsiveness to the monocytosis-producing activity of *Listeria monocytogenes* in mice genetically susceptible or resistant to listeriosis.

Infection 16, Suppl. 2, 118-122

GASPAROVIC, E. (1988):

Untersuchungen über das Vorkommen von *Listeria monocytogenes* in Rohmilch in Südwürttemberg.

Diss. med. vet., München

GEOFFROY, C., J. L. GAILLARD, J. E. ALOUF und P. BERCHE (1987):

Purification, characterization, and toxicity of the sulfhydryl-activated hemolysin listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*.

Infect. Immun. 55, 1641-1646

GODFREY, R. W. und M. S. WILDER (1985):

Generation of oxygen species and virulence of *Listeria monocytogenes*.

Infect. Immun. 47, 837-839

GOEBEL, W., S. KATHARIOU, M. KUHN, Z. SOKOLOVIC, J. KREFT,

S. KÖHLER, D. FUNKE, T. CHAKRABORTY, und M. LEIBMEISTER-WÄCHTER (1988):

Hemolysin from *Listeria* - biochemistry, genetics and function in pathogenesis.

Infection 16, Suppl. 2, 149-156

GOETZ, H. (1987):

Enterokokken als störende Keime beim Listerianachweis.

DMZ (1988) 109, 11-14

GORET, P. und J. OUDAR (1965):

Les listérioses animales. Fréquence et incidence éventuelle chez l'homme.

Revue de Pathologie comparée 65, 603-626

GRAY, M. L. und A. H. KILLINGER (1966):

Listeria monocytogenes and listeric infections.

Bacteriol. Rev. 30, 309-382

GRAY, M. L., H. J. STAFSETH, F. THORP, L. B. SHOLL und W. F.

RILEY (1948):

A new technique for isolating Listerellae from the bovine brain

J. Bact. 55, 471-476

GROVES, R. D. und H. J. WELSHIMER (1977):

Separation of pathogenic from apathogenic Listeria monocytogenes by three in vitro reactions.

J. Clin. Microbiol. 5, 559-563

HALBERT, S. P. (1970):

Streptolysin O.

In: MONTIE, T. C., S. KADIS und S. J. AJIL: Microbial toxins, Vol. 3, p.69-98

Academic Press, New York und London

HENRY, B. S. (1933):

Dissociation of the genus Brucella.

J. Infect. Dis. 52, 374-402

HEYERMANN, H. und B. SENFT (1985):

Zusammenhänge zwischen Phagozytoseaktivität und Mobilisierung neutrophiler Granulozyten des Rindes nach experimenteller Irritation der Milchdrüse.

Zbl. Vet. Med. B, 32, 593-600

HOF, H. (1984):

Virulence of different strains of Listeria monocytogenes serovar 1/2 a.

Med. Microbiol. Immunol. 173, 207-218

HOF, H. und P. HEFNER (1988):

Pathogenicity of *Listeria monocytogenes* in comparison to other *Listeria* species.

Infection 16, Suppl. 2, 141-144

HOF, H., H. P. R. SEELIGER und S. CHATZIPANAGIOTOU (1986):

The role of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. in foodborne infections.

Proc. 2nd World Congress Foodborne Infections and Intoxications, Berlin (West) 1986, Vol.1, 221-223

HUNTER, R. (1973):

Observations on *Listeria monocytogenes* type 5 (Iwanow) isolated in New Zealand.

Med. Lab. Techn. 30, 51-56

IKONOMOV, L. (1969):

Microbiological studies on the pasteurization of ewes' milk. VI. Comparison of effects on HTST pasteurization at different temp..

Vet. Med. Nauki, Sof. 6 (6), 71-76

Ref. in: Dairy Sci. Abstr. 32, (1970), 116-117, Nr. 741

IKONOMOV, L. und D. TODOROV (1967):

Microbiological studies on the pasteurization of ewes' milk.

III. Resistance of some pathogenic bacteria.

Vet. Med. Nauki, Sof. 4 (3), 99-108

Ref. in: Dairy Sci. Abstr. 29 (1967), 568, Nr. 3995

IWANOW, I. (1962):

Untersuchungen über die Listeriose der Schafe in Bulgarien

Mh. Vet. Med. 17, 729-736

JAEGER, R. F. und D. M. MYERS (1954):

Listeria monocytogenes - a study of two strains isolated from human listeriosis.

Can. J. Microbiol. 1, 12-21

JAMES, S. M., S. L. FANNIN, B. A. AGEE, B. HALL, E. PARKER,
J. VOGT, G. RUN, J. WILLIAMS, L. LIEB, C. SALMINEN, T.
PRENDERGAST, S. B. WERNER und J. CHIN (1985):

Listeriosis outbreak associated with Mexican-style cheese -
California.

Morbid. Mortal. Weekly Rep. 34, 357-359

JENKINS, E. M. und B. B. WATSON (1971):

Extracellular antigens from *Listeria monocytogenes*.

I. Purification and resolution of hemolytic and lipolytic
antigens from culture filtrates of *Listeria monocytogenes*.

Infect. Immun. 3, 589-594

JENKINS, E. M., A. N. NJOKU-OBI und E. W. ADAMS (1964):

Purification of the soluble hemolysins of *Listeria monocytogenes*.

J. Bacteriol. 88, 418-424

JENTZSCH, K. D. (1958):

Zur fleischbeschaulichen Beurteilung listeriosekranker
Schlachttiere.

Mh. Vet. Med. 13, 679-684

JONES, D. (1988):

The place of *Listeria* among gram-positive bacteria.

Infection 16, Suppl. 2, 85-88

JULIANELLE, L. A. und C. A. PONS (1939):

Immunological and serological reactions of *Listerella*
monocytogenes.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 40, 364-365

KAMPELMACHER, E. H. und L. M. van NOORLE JANSEN (1972a):

Further studies on the isolation of *L. monocytogenes* in
clinically healthy individuals.

Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 221, 70-77

KAMPELMACHER, E. H. und L. M. van NOORLE JANSEN (1972b):

Isolierung von *L. monocytogenes* mittels

Nalidixinsäuretrypaflavin.

Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 221, 139-140

KAMPELMACHER, E. H., W. T. HUYSINGA und L. M. van NOORLE JANSEN
(1972):

The presence of *Listeria monocytogenes* in feces of pregnant women
and neonates.

Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 222, 258-262

KAMPELMACHER, E. H., D. E. MAAS und L. M. van NOORLE JANSEN
(1976):

Occurrence of *Listeria monocytogenes* in faeces of pregnant women
with and without direct animal contact.

Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 234, 238-242

KAUTTER, D. A., S. J. SILVERMAN, W. G. ROESSLER und J. F. DRAWDY
(1963):

Virulence of *Listeria monocytogenes* for experimental animals.

J. Infect. Dis. 112, 167-180

KEMENES, F. (1972):

Pathogenicity of *Listeria monocytogenes* in the rat.

Acta microbiol. Acad. Sci. hung. 19, 429-432

KHAN, M. A., A. SEAMAN und M. WOODBINE (1972):

The pathogenicity of *Listeria monocytogenes*.

Acta microbiol. Acad. Sci. hung. 19, 421-426

KHAN, M. A., A. SEAMAN und M. WOODBINE (1973):

Listeria monocytogenes-haemolysin: lecithinase.

Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 225, 66-79

KINGDON, G. C. und C. P. SWORD (1970a):

Effect of *Listeria monocytogenes* hemolysin on phagocytic cells
and lysosomes.

Infect. Immun. 1, 356-362

DIESELBEN (1970b):

Cardiotoxic and lethal effects of *Listeria monocytogenes* hemolysin.

Infect. Immun. 1, 373-379

KLUGE, R. und H. HOF (1986):

Zur Virulenz von *Listeria welshimeri*.

Zbl. Bakt. Hyg. A 262, 403-411

KNORZ, W. und H. HOF (1986):

Zur Pathogenität von Listerien.

Immun. Infekt. 14, 76-80

LARSEN, H. E. und H. P. R. SEELIGER (1966):

A mannitol fermenting *Listeria*: *Listeria grayi* sp. n..

Proc. 3rd International Symposium on Listeriosis, Bilthoven, 35-39

LEHNERT, C. (1964):

Bakteriologische, serologische und tierexperimentelle Untersuchungen zur Pathogenese, Epizootologie und Prophylaxe der Listeriose.

Arch. exp. Vet.-Med. 18, 981-1027 und 1247-1302

LOVETT, J., D. W. FRANCIS und J. M. HUNT (1987):

Listeria monocytogenes in raw milk: detection, incidence, and pathogenicity.

J. Food Prot. 50, 188-192

LOVETT, J. (1988):

Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* in dairy products.

J. Assoc. Off. Anal. Chem. 71, 658-660

MACKANESS, G. B. (1962):

Cellular resistance to infection.

J. Exp. Med. 116, 381-406

MACLEOD, N. S. M. und J. A. WATT (1974):

Listeria monocytogenes type 5 as a cause of abortion in sheep.
Vet. Rec. 95, 365-367

MAYR, A., P. A. BACHMANN, B. BIBRACK und G. WITTMANN (1974):

Virologische Arbeitsmethoden, Bd. I, p. 404-405 u. 413-414,
Verlag Gustav Fischer, Stuttgart

McCLAIN, D. und W. H. LEE (1988):

Development of USDA-FSIS method for isolation of *Listeria*
monocytogenes from raw meat and poultry.

J. Assoc. Off. Anal. Chem. 71, 660-664

MEYER, R. R., G. S. PROBST und S. J. KELLER (1972):

RNA synthesis by isolated mammalian mitochondria and nuclei:
effects of ethidium bromide and acriflavin.

Arch. Biochem. Biophys. 148, 425-430

METHODENKOMMISSION (Deutsche Kommission zur Vereinheitlichung der
Untersuchungsmethoden für Milch, Milchprodukte und
Molkereihilfsstoffe) (1960):

Die mikrobiologischen Methoden für die Untersuchung von Milch und
Milcherzeugnissen.

Milchwiss. 15, 120-129

MIELKE, M., S. EHLERS und H. HAHN (1988):

The role of T-cell subpopulations in cell mediated immunity to
facultative intracellular bacteria.

Infection 16, Suppl. 2, 123-127

MORRIS, M. C. und L. A. JULIANELLE (1935):

A study of an ocular infection induced experimentally with
Bacterium monocytogenes.

J. Ophthal. 18, 535-541

- MURRAY, E. G. D., R. A. WEBB und M. B. R. SWANN (1926):
A disease of rabbits characterised by a large mononuclear
leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium*
monocytogenes (n. sp.).
J. Path. 29, 407-439
- NJOKU-OBI, A. N., E. M. JENKINS, J. C. NJOKU-OBI, J. ADAMS und V.
COVINGTON (1963):
Production and nature of *Listeria monocytogenes* hemolysins.
J. Bacteriol. 86, 1-8
- NORTHOLT, M.D., H. J. BECKERS, U. VECHT, L. TOEPOEL, P. S.
SOENTORO und H. J. WISSELINK (1988):
Listeria monocytogenes: heat resistance and behaviour during
storage of milk and whey and making of dutch types of cheese.
Neth. Milk Dairy J. 42, Nr. 2, 207-219
- OBIGER, G. (1976):
Untersuchungen über die Thermostabilität bedeutsamer
Infektionserreger unter den Bedingungen der Milchpasteurisation.
Arch. Lebensmittelhyg. 27, 137-144
- ÖZGEN, H. (1951):
Über die *Listeria monocytogenes*.
Diss. med. vet., Gießen
- OLSON, J. C. und P. M. NOTTINGHAM (1980):
Temperature.
In: SILLIKER, J. R., R. P. ELLIOT, A. C. BAIRD-PARKER, F. L.
BRYAN, J. H. B. CHRISTIAN, D. S. CLARK; J. C. OLSON, Jr., T. A.
ROBERTS: Microbial ecology of foods, Vol. I. Factors affecting
life and death of microorganisms, p. 1-37
Academic Press, New York, London, Toronto, Sydney und San
Francisco
- ORTEL, S. (1972):
Experience with nalidixic acid-trypaflavine agar.
Acta microbiol. Acad. Sci. hung. 19, 363-365

ORTEL, S. (1975):

Schwangerschaftslisteriose und Listerienausscheider bei
Laboratoriumspersonal.

Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 231, 491-502

PARRISIUS, J., S. BHAKDI, M. ROTH, J. TRANUM-JENSEN, W. GOEBEL
und H. P. R. SEELIGER (1986):

Production of listeriolysin by beta-hemolytic strains of *Listeria*
monocytogenes.

Infect. Immun. 51, 314-319

PATERSON, J. S. (1940a):

The antigenic structure of organisms of the genus *Listerella*.

J. Path. Bact. 51, 427-436

DERSELBE (1940b):

Experimental infection of the chick embryo with organisms of the
genus *Listerella*.

J. Path. Bact. 51, 437-440

PATOCKA, F., E. MENCIKOVA, H. P. R. SEELIGER und A. JIRASEK
(1979):

Neurotropic activity of a strain of *Listeria innocua* in suckling
mice.

Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 243, 490-498

PINI, P. N. und R. J. Gilbert (1988):

The occurrence in the U.K. of *Listeria* species in raw chickens and
soft cheeses.

Int. J. Food Microbiol. 6, 317-326

PIRIE, J. H. H. (1927):

A new disease of veld rodents. "Tiger River disease".

Publications of South African Institute for Medical Research 3,
163-186

DERSELBE (1940):

Listeria: change of name for a genus of bacteria.

Nature 145, 264

PONGRATZ, G. (1982):

Untersuchungen über das Hämolysin der Serovarietät 5 von *Listeria monocytogenes*.

Diss. med., Würzburg

PONGRATZ, G. und H. P. R. SEELIGER (1984):

Hämolysewirkungen durch *Listeria innocua* auf Schaferythrozyten.

Zbl. Bakt. Hyg. A 257, 296-307

POTEL, J. (1950/51):

Die Morphologie, Kultur und Tierpathogenität des *Corynebakterium infantisepticum*.

Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 156, 490-493

DERSELBE (1953/54):

Ätiologie der Granulomatosis Infantiseptica.

Wiss. Z. Univ. Halle III M, 341-364

DERSELBE (1955).

Sechs Jahre Listeriose-Forschung und -Diagnose mit besonderer Berücksichtigung der Neugeborenen-Listeriose.

Arch. Hyg. 139, 245-264

PREVOT, A.-R. (1961):

Traité de Systématique Bactérienne, Vol. 2, p. 511-512

Dunod, Paris

RALOVICH, B. (1988):

Methods to determine virulence of *Listeria* strains.

10th International Symposium on Listeriosis, Pécs, Ungarn

RALOVICH, B., L. EMÖDY und E. MERÖ (1972):

Biological properties of virulent and avirulent *Listeria monocytogenes* strains.

Acta microbiol. Acad. Sci. hung. 19, 323-326

RALOVICH, B., A. FORRAY, E. MERÖ, H. MALOVICS und I. SZAZADOS
(1971):

New selective medium for isolation of *L. monocytogenes*.

Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 216, 88-91

ROCOURT, J. (1988):

Taxonomy of the genus *Listeria*.

Infection 16, Suppl. 2, 89-91

ROCOURT, J. und P. A. D. GRIMONT (1983):

Listeria welshimeri sp. nov. and *Listeria seeligeri* sp. nov..

Int. J. Syst. Bacteriol. 33, 866-869

ROCOURT, J. und A. SCHRETTENBRUNNER (1985):

Listeria seeligeri.

medwelt 36, 1522-1525

ROCOURT, J. und H. P. R. SEELIGER, (1983):

Virulence comparée des cinq groupes génomiques de *Listeria*
monocytogenes (sensu lato).

Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur) 134 A, 359-364

ROCOURT, J. und H. P. R. SEELIGER (1985):

Distribution des espèces du genre *Listeria*.

Zbl. Bakt. Hyg. A 259, 317-330

ROCOURT, J., A. SCHRETTENBRUNNER und H. P. R. SEELIGER (1983):

Différenciation biochimique des groupes génomiques de *Listeria*
monocytogenes (sensu lato).

Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur) 134 A, 65-71

ROCOURT, J., U. WEHMEYER und E. STACKEBRANDT (1987a):

Transfer of *Listeria denitrificans* to a new genus, *Jonesia* gen.
nov., as *Jonesia denitrificans* comb. nov..

Int. J. Syst. Bacteriol. 37, 266-270

ROCOURT, J., F. GRIMONT, P. A. D. GRIMONT und H. P. R. SEELIGER (1982):

DNA relatedness among serovars of *Listeria monocytogenes* sensu lato.

Curr. Microbiol. 7, 383-388

ROCOURT, J., U. WEHMEYER, P. COSSART und E. STACKEBRANDT (1987b): Proposal to retain *Listeria murrayi* and *Listeria grayi* in the genus *Listeria*.

Int. J. Syst. Bacteriol. 37, 298-300

ROCOURT, J., H. HOF, A. SCHRETTENBRUNNER, R. MALINVERNI und J. BILLE (1985):

Virulence moderee d' une souche humaine de *Listeria seeligeri*. Proc. 9th International Symposium on the Problems of Listeriosis, Nantes, 266-270

SCHEFFER, J., W. KÖNIG, V. BRAUN und W. GOEBEL (1988):

Comparison of four hemolysin-producing organisms (*Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Aeromonas hydrophila*, and *Listeria monocytogenes*) for release of inflammatory mediators from various cells.

J. Clin. Microbiol. 26, 544-551

SCHLECH, W. F., P. M. LAVIGNE, R. A. BORTOLUSSI, A. C. ALLEN, E. V. HALDANE, A. J. WORT, A. W. HIGHTOWER, S. E. JOHNSON, S. H. KING, E. S. NICHOLLS und C. V. BROOME (1983):

Epidemic listeriosis - evidence for transmission by food.

N. Engl. J. Med. 308, 203-206

SCHÖNBERG, A. (1987):

Identifizierung der Listerien und die Infektionen des Menschen durch *Listeria monocytogenes* unter Berücksichtigung der Serovare.

40. Arbeitstagung des Arbeitskreises Lebensmittelhygienischer Tierärztlicher Sachverständiger, Berlin,

Anhang 1: Sachverständigengespräch "Listeriose", 75-78

SCHOOP, G. (1951):

Listeria monocytogenes, ein Krankheitserreger unserer Haustiere.
Dtsch. tierärztl. Wschr. 58, 293-294

SCHULZE, D. (1957):

Untersuchungen über die Hitzeresistenz von Listerien mit
besonderer Berücksichtigung der Milchpasteurisierung.
Diss. med. vet., Leipzig

SEELIGER, H. P. R. (1961):

Listeriosis, p. 11 u. 44-52
Verlag S. Karger, Basel - New York

DERSELBE (1981):

Apathogene Listerien: *L. innocua* sp. n. (Seeliger et Schoofs,
1977).
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 249, 487-493

DERSELBE (1984):

Modern taxonomy of the *Listeria* group. Relationship to its
pathogenicity.
Clinical & Investigative Medicine 7, 217-221

DERSELBE (1987):

Listeriose-aktuell.
DMW 112, 359-361

DERSELBE (1988):

Listeriosis - history and actual developments.
Infection 16, Suppl. 2, 80-84

SEELIGER, H. P. R. und K. HÖHNE (1979):

Serotyping of *Listeria monocytogenes* and related species.
In: BERGAN, T. und J. R. NORRIS: Methods in Microbiology, Vol.
13, p. 31-49
Academic Press, London, New York, Toronto, Sydney und San
Francisco

SEELIGER, H. P. R. und D. JONES (1986):

Genus *Listeria* Pirie 1940, 383^{AL}.

in: BERGEY'S MANUAL of Systematic Bacteriology, Vol. 2, p.
1235-1245

Williams & Wilkins, Baltimore

SEELIGER, H. P. R. und G. LINZENMEIER (1953):

Die Listeriose und ihre Erreger (*List. monocytogenes*).

Zeitschr. f. Hygiene 136, 335-378

SEELIGER, H. P. R., A. SCHRETTENBRUNNER, G. PONGRATZ

und H. HOF (1982):

Zur Sonderstellung stark hämolysierender Stämme der Gattung
Listeria.

Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 252, 176-190

SEELIGER, H. P. R., J. ROCOURT, A. SCHRETTENBRUNNER, P. A. D.

GRIMONT und D. JONES (1984):

Listeria ivanovii sp. nov..

Int. J. Syst. Bacteriol. 34, 336-337

SEGRE, D., C. OLSON, C. L. MARSH und I. C. BLORE (1956):

Attempts to influence Listeriosis in chickens using
antimetabolites.

Amer. J. vet. Res. 17, 299-302

SIDDIQUE, I. H. (1969):

Cytotoxic activity of hemolysin from *Listeria monocytogenes* on
L-M strain of mouse cells.

Can. J. Microbiol. 15, 955-957

SIDDIQUE, I. H. und G. W. COOPER (1969):

Hemodynamic effect of listerial hemolysin in dogs.

Am. J. Physiol. 216, 1399-1403

SIDDIQUE, I. H., I-FONG LIN und R. A. CHUNG (1974):

Purification and characterization of hemolysin produced by
Listeria monocytogenes.

Am. J. vet. Res. 35, 289-296

SIEGMANN, O. (1983):

Kompodium der Geflügelkrankheiten, p. 59-60

Verlag M. & H. Schaper, Hannover

SKOVGAARD, N. und C-A. MORGEN (1988):

Detection of *Listeria* spp. in faeces from animals, in feeds, and in raw foods of animal origin.

Intern. J. Food Microbiol. 6, 229-242

STAJNER, B., S. ZAKULA, I. KOVINCIC und M. GALIC (1979):

Heat resistance of *Listeria monocytogenes* and its survival in raw milk products.

Veterinarsky Glasnik 33 (2), 109-112

Ref. in: Dairy Sci. Abstr. 43 (1981), 346, Nr. 2793

STENBERG, H. und T. HÄMMÄINEN (1955):

Om *Listeria monocytogenes*' resistens mot koksalt och värmeinverkan vid in vitro försök samt om experimentellt framkallad monocytos hos vita möss.

Nord. Vet.-Med. 7, 853-868

STREICHAN, D. (1967):

Das Verhalten einiger menschenpathogener Keime und Bakterientoxine in Lebensmitteln und ihre Abtötung durch eine Hitzebehandlung der Lebensmittel.

I. Salmonellen.

Arch. Lebensmittelhyg. 18, 284-288

STUART, S. E. und H. J. WELSHIMER (1973):

Intragenetic relatedness of *Listeria* Pirie.

Int. J. Syst. Bacteriol. 23, 8-14

DIESELBEN (1974):

Taxonomic reexamination of *Listeria* Pirie and transfer of *Listeria grayi* and *Listeria murrayi* to a new genus, *Murraya*.

Int. J. Syst. Bacteriol. 24, 177-185

SWORD, C. P. (1966):

Mechanisms of pathogenesis in *Listeria monocytogenes* infection.

I. Influence of iron.

J. Bacteriol. 92, 536-542

TERPLAN, G., R. SCHOEN, W. SPRINGMEIER, I. DEGLE und H. BECKER (1986):

Vorkommen, Verhalten und Bedeutung von Listerien in Milch und Milchprodukten.

Arch. Lebensmittelhyg. 37, 131-137

URBANECK, D. (1961):

Ein Beitrag zur experimentellen Listeriose bei Laboratoriums- und Haustieren. II. Mitteilung: Zur Pathogenese der Listeriose beim Meerschweinchen.

Arch. exp. Vet.-Med. 15, 557-595

van FURTH, R., W. SLUITER und J. T. van DISSEL (1988):

Roles of factors increasing monocytogenesis (FIM) and macrophage activation in host resistance to *Listeria monocytogenes*.

Infection 16, Suppl. 2, 136-140

von KOENIG, C. H. W., B. HEYMER, H. HOF und H. FINGER (1983):

Course of infection and development of immunity in experimental infection of mice with *Listeria* serotypes.

Infect. Immun. 40, 1170-1177

WELSHIMER, H. J. (1968):

Isolation of *Listeria monocytogenes* from vegetation.

J. Bact. 95, 300-303

WELSHIMER, H. J. und A. L. MEREDITH (1971):

Listeria murrayi sp. n.: a nitrate-reducing mannitol-fermenting *Listeria*.

Int. J. Syst. Bacteriol. 21, 3-7

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) (1988):

Foodborne Listeriosis.

Report of a WHO Informal Working Group, Genf

WOOD, L. und M. WOODBINE (1977):

Listeria monocytogenes: low temperature virulence in the chick embryo.

Proc. 7th International Symposium on Listeriosis, Varna 1977

ZELLER, M. (1949):

Die morphologischen und kulturell nachweisbaren biologischen Eigenschaften der *Listeria monocytogenes* (Murray) Pirie.

Diss. med. vet., Gießen

ZINK, A., G. C. deMELLO und R. L. BURKHART (1951):

Listeriosis - field and laboratory studies, and aureomycin activity.

Am. J. vet. Res. 12, 194-198

Herrn Professor Dr. G. Terplan möchte ich an dieser Stelle ganz herzlich für die Überlassung des Themas, seine freundliche Unterstützung und die wertvollen Anregungen bei der Ausführung dieser Arbeit danken.

Ebenso gilt mein besonderer Dank Frau Dr. R. Schoen für ihre stets freundliche Hilfe und ihr Interesse, das sie meiner Arbeit entgegengebracht hat.

Danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. H. Kessler für die Möglichkeit, an seinem Institut die Pasteurierungsversuche durchzuführen.

Herrn Prof. Dr. H. Mahnel sei an dieser Stelle für die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen gedankt.

Herrn Prof. Dr. J. Meyer möchte ich für die Ermöglichung der Versuche am Lehr- und Versuchsgut Oberschleißheim danken.

Ganz besonders möchte ich auch Frau Dr. Wessling vom TGD, Grub für ihre hilfreiche Beratung bei der Bebrütung der Hühnereier danken.

Mein Dank gilt auch allen Mitarbeitern des Institutes, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, insbesondere Frau H. Schäffer für die Unterstützung bei der Durchführung der Versuche sowie Frau Schmidt für die Durchsicht der Literatur.

LEBENS LAUF

Name:	Sabine Waltraud Steinmeyer
Geburtsdatum:	21.10.1962
Geburtsort:	Nördlingen
Eltern:	Kurt Steinmeyer und Ulrike Steinmeyer, geb. Blaha
1969-1973:	Grundschule in Nördlingen
1973-1981:	Theodor-Heuss-Gymnasium in Nördlingen
Juni 1981:	Abitur
1981-1987:	Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
Februar 1987:	Approbation als Tierärztin
März 1987-	Anfertigung der vorliegenden Arbeit am
November 1988:	Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch der Ludwig-Maximilians-Universität München; seit 01.10.1988 als wissen- schaftliche Hilfskraft an diesem Lehrstuhl tätig

